Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-,
Nasen- und Ohrenkranke im Kopfklinikum Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Kley

BEITRAG ZUR BESTIMMUNG DER SAUREN MUCOPOLYSACCHARIDE IM SERUM UND URIN OTOSKLEROSEKRANKER PATIENTEN

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Rudolf Singgih TJANDRAKUSUMA
aus Surabaja-Indonesien

Würzburg, den 1 Juli 1982

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-,
Nasen- und Ohrenkranke im Kopfklinikum Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. W. Kley

B E I T R A G Z U R B E S T I M M U N G
D E R S A U R E N M U C O P O L Y S A C C H A R I D E
I M S E R U M U N D U R I N
O T O S K L E R O S E K R A N K E R P A T I E N T E N

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Rudolf Singgih TJANDRAKUSUMA
aus Surabaja-Indonesien

Würzburg, den 1 Juli 1982

Referent: Prof. Dr. med. W. Kley

Korreferent: P.D. Dr. med. H. F. Zenner

Dekan: Prof. Dr. med. K. A. Bushe

Tag der mündlichen Prüfung: 6.12.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
B.1.	Otosklerose	5
B.2.	Mucopolysaccharidosen	8
B.3.	Osteogenesis imperfecta	10
B.4.	Morbus Paget	11
B.5.	Ätiologie der Otosklerose	16
B.5.1.	Biochemische Faktoren	16
B.5.2.	Anatomische und mechanische Faktoren	17
B.6.	Saure Mucopolysaccharide	18
B.6.1.	Hyaluronsäure	19
B.6.2.	Chondroitinsulfat	20
B.6.3.	Keratansulfat	22
B.6.4.	Heparin	23
B.7.	Glykoproteine	25
C.	METHODE	27
C.1.	Ausfällung nach Hitzedenaturierung	27
C.2.	Extraktion mit Phenol	28
C.2.1.	Metachromasie	29
C.3.	Volumenverschiebung bei der Extraktion mit Phenol	29
C.3.1.	Verteilungskinetik	32
C.4.	Nachweis saurer Mucopolysaccharide und saurer Glykoproteide im Urin	32
C.5.	Eigenes Verfahren	35
C.5.1.	Probenvorbereitung	35
C.5.2.	Abtrennung störender Proteine	35
C.5.3.	Eiweißextraktion mit Phenol	36
C.5.4.	Eiweißextraktion mit Phenol bei Urin	38
C.6.	Nachweisreaktionen	38
C.6.1.	Toluidinblau "O"	38
C.6.2.	Alcianblau 8GX	39

Seite

C.6.3. Methylgrün 40
C.6.4. Azur-A 40
C.7. Ansatz 41
C.8. Eichkurve 42
C.9. Eichsubstanz 45
C.10. Herstellung des Standards 45

D. ERGEBNISSE 47
D.1. U-Test von Mann - Whitney - Wilcoxon 54

E. DISKUSSION 57

F. ZUSAMMENFASSUNG 60

G. LITERATURVERZEICHNIS . . . . . I-XIV

A. E I N L E I T U N G

Das Ziel der Arbeit ist die Veränderungen einer Fraktion saurer Mucopolysaccharide und Glykoproteide als essentielle Komponente des Knochenstoffwechsels im Blut und Urin bei Otosklerose zu erfassen.
Sie dient damit der zusätzlichen Absicherung der klinischen Diagnose (wie Familienanamnese, Hörbefund, Tinnitus, otoskopischer Befund, Schwartze'sches Zeichen, Röntgenbefund und pharmakologische Schädigung) besonders bei Kapselotosklerose.

Bei Otosklerose kann durch die hereditäre Komponente

- belegt durch gehäuftes familiäres Auftreten und bevorzugung der weißen Rasse (Shambaugh 1959; Nager 1947; Cawthorne 1955; Guild 1944; Sèrcer 1961)

und hormonelle Komponente

- belegt durch die klinische Verschlechterung der Otosklerose bei der Pubertät, Schwangerschaft, Menopause (Tarasenkova 1967; Seifert 1937) und eine häufig vermutete Verschlechterung der Symptome der Otosklerose bei Einnahme oraler Kontrazeptiva (Rundtischgespräch Chicago 1977; Zit. nach Plester 1979)

eine besondere Stoffwechsellage mit geringfügigen Veränderungen der Blut- und Urinchemie angenommen werden.
Betrachtet man Otosklerose als eine Art der Knochenerkrankung, dann läßt sich vermuten, daß die angenommenen Veränderungen der Blut- und Urinchemie bevorzugt durch die Stoffwechselprodukte des Skeletts hervorgerufen werden.
Hierzu gehören Ionen wie Ca^{++}, HPO_4^{--}, K^+, CO_3^{--}, H_3O^+= pH; Hormone (Calcitonin); Enzyme (alkalische Phosphatase, Kollagenase, Galaktosaminidase, Hydroxyprolinaminopeptidase); Kollagen (Hydroxyprolin, Hydroxylysin) und Grundsubstanz (saure Mucopolysaccharide).

In Bezug auf die Calcium, Phosphat und alkalische Phosphatase läßt sich keine sichere Aussage machen, da die Ergebnisse

verschiedener Autoren voneinander abweichen.
Breitmann (1933) fand sowohl eine Abnahme als auch Zunahme des Calcium- und Phosphatgehaltes im Serum bei der Otosklerose.
Fowler (1948) und Riskaer (1949) sahen keinen signifikanten Unterschied des Calcium- und Phosphatgehaltes und der Aktivität alkalischer Phosphatase im Serum von Otosklerosekranken, was durch weitere Untersuchungen von Na^+, K^+, Ca^{++}, AP, CK in dieser Klinik bestätigt werden konnte.

Die biochemischen Untersuchungen der Perilymphe von Otosklerosekranken zeigten keine Veränderung des Calcium- und Phosphatgehaltes (Wullstein et al. 1960).
Wullstein et al. (1960) konnten aber einen erheblichen Anstieg des Gehaltes an alkalischer Phosphatase in der Perilymphe von Otosklerosekranken nachweisen.
1975 wies Chevance auf einen Anstieg hydrolytischer Enzyme (z.B. Trypsin) in der Perilymphe von Patienten mit fortschreitender aktiver Otosklerose hin.

Da weder im Serum noch im Urin bei Calcium, Phosphat und pH signifikante Veränderungen auffallen, soll hier nochmals eine Fraktion saurer Mucopolysaccharide in Blut und Urin bei einer größeren Patientenstichprobe untersucht werden, nachdem Zechner und Soifer sich nur auf deren Bestimmung im Urin beschränkten. Zechner ließ bei einem kleinen Kollektiv wegen Otosklerose operierter Patienten die Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Urin überprüfen.
Sie wurde nur bei aktiven Otosklerosen (rote weiche Herde) vermehrt gefunden.
Sie war aber stets negativ bei Ringbandsklerosen, alten inaktiven Otoskleroseherden.
Zechner sah insgesamt dreimal bei aktiver roter Otosklerose deutlich erhöhte Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Urin.

Soifer fand bei einem Stichprobenumfang von 34 Otosklerosekranken und von 36 männlichen Patienten ohne Otosklerose keinen Unterschied in der Urinausscheidung der Gesamtmucopoly-

saccharide oder der einzelnen Fraktionen.
Die seinem Diagramm entnommene Tabelle zeigt Hexuronsäure (mg/g Kreatinin) im 24 Std-Urin.

Tbl. 1: Saure Mucopolysaccharide im Urin otosklerosekranker und nicht otosklerosekranker Patienten nach Soifer. Dimension: mg Hexuronsäure/g Kreatinin.

Stichprobe 1	Otosklerosekranke
Anzahl =	34.00
Mittelwert =	44.95
Standardabweichung =	16.42
Min-Wert =	17.00
Max-Wert =	85.50
U-Wert =	562.00
Stichprobe 2	Nicht Otosklerosekranke
Anzahl =	36.00
Mittelwert =	42.41
Standardabweichung =	18.49
Min-Wert =	12.00
Max-Wert =	81.00
U-Wert =	662.00
Signifikanz =	.58

Die von Soifer und Mitarbeiter erhobenen negativen Befunde können mit den alten inaktiven Herden oder Ringbandsklerosen in Zusammenhang gebracht werden.
Unter statistischen Aspekten würde man bei den Ergebnissen von Soifer einen leicht erhöhten Wert bei otosklerosekranken Patienten erwarten.

Die differierende Meinung von Zechner und Soifer bezüglich der sauren Mucopolysaccharide im Urin fordert zur Untersuchung einer größeren Patientengruppe auf.
Doch es ist nicht der Stichprobenumfang allein, der Anlaß zu weiteren Nachforschungen gibt - auch die Bestimmungsmethode

selbst ist nicht problemlos, wie die Arbeit von Hilborn über die elektrophoretische Auftrennung und quantitative Bestimmung saurer Mucopolysaccharide zeigt.
Desweiteren wurde die geringfügige, vom Molgewicht abhängige Urinausscheidung dieser makromolekularen Komponenten (Kaiser 1969) nicht im nötigen Umfang berücksichtigt, was sich nur in Verbindung mit Serumbestimmungen durchführen läßt.

Das Verhalten saurer Mucopolysaccharide im Serum und Urin bei otoskleroseähnlichen Erkrankungen - Morbus Paget; Osteogenesis imperfecta; Morbus Pfaundler Hurler - ist von besonderem Interesse.

Bei Morbus Paget und Osteogenesis imperfecta wurde eine Abnahme der sauren Mucopolysaccharide im Urin beobachtet, sie konnte jedoch statistisch nicht abgesichert werden (Kaiser 1969; Turakainen 1980; Berggren 1969; Hurst 1980).

Saure Mucopolysaccharide (mg/Tag) im Urin:

Norm*	$\bar{x}$ = 9,82	$\bar{S}$ = 4,53	n = 6
Morbus Paget*	$\bar{x}$ = 6,47	$\bar{S}$ = 1,85	n = 3
Osteogenesis imperfecta*	$\bar{x}$ = 7,38	$\bar{S}$ = 1,15	n = 3

Bei Mucopolysaccharidosen besteht eine deutliche Erhöhung der sauren Mucopolysaccharide im Urin (Zechner und Altmann 1968; Kaiser 1969; Luderschmidt 1979; Meyer 1958; Eto 1979; Gitzelmann 1978).

Saure Mucopolysaccharide (mg/Tag) im Urin:

Norm*	$\bar{x}$ = 9,82	$\bar{S}$ = 4,53	n = 6
M.Pfaundler Hurler*	$\bar{x}$ = 26,75	$\bar{S}$ = 7,75	n = 2
Mucopolysaccharidosis 7*	$\bar{x}$ = 173,00	$\bar{S}$ = 41,00	n = 2
Hunter Syndrom*	$\bar{x}$ = 34,71	$\bar{S}$ = 6,29	n = 3

*Anmerkung: Untersuchungen von Kaiser.
Summenwerte von Chondroitinsulfat A/C, Chondroitinsulfat B und Heparansulfat in mg/Tag.

B. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

B.1. Otosklerose

Otosklerose ist eine häufig beide Labyrinthkapseln betreffende Knochenerkrankung, die sich sowohl auf die Mineralisation als auch auf die unten besprochene organische Matrix (sog. "blaue Mäntel") auswirkt (Zechner und Manolidis 1972).
1894 bezeichnete Politzer Otosklerose als eine primäre Erkrankung der knöchernen Labyrinthkapsel.

Die klinische Bedeutung dieser Erkrankung ist durch die resultierende Schwerhörigkeit charakterisiert, die sich meist zwischen dem 15. und 40. Lebensjahr manifestiert.
Nach Gristwood (1966) beginnt dieses klinische Bild bei 80 % der Otosklerosekranken vor dem 25. Lebensjahr.
Neben der Schalleitungsschwerhörigkeit leiden nach Nager (1947) 67 % der Otosklerosekranken an Tinnitus unterschiedlicher Intensität.

Histologisch finden sich otosklerotische Veränderungen (histologische Otosklerose) bei ca. 10 % aller Felsenbeine der weißen Rasse und etwa 1 % aller Menschen der weißen Rasse dürften an einer Otosklerose-Schwerhörigkeit (klinische Otosklerose) leiden (Larsson 1960 und 1963; Guild 1944; Fowler 1949; Cawthorne 1955).
Nur jeder zehnte Weiße mit histologisch nachweisbarer Otosklerose erkrankt also manifest (!).

Larsson rechnete, daß der Grad klinischer Manifestation der Otosklerose zwischen 15 und 35 % liegt.
Die Mehrzahl der früheren Untersuchungen über das Vorkommen klinischer Otosklerose zeigten, daß Frauen doppelt so häufig wie Männer befallen sind (Davenport, Milles und Frink 1933).
Neuere Untersuchungen an Patientenkollektiven mit klinischer Otosklerose ergaben folgende relative Häufigkeit bei Frauen

68 % (Larsson, n = 262); 64 % (Nager, n = 1146) und 67.5 % (Cawthorne, n = 2000).

Bei der histologischen Otosklerose fanden die Autoren dagegen mehr ausgeglichene Verteilung zwischen den Geschlechtern. Weber (1935) fand die Verhältnisse zwischen Männern und Frauen wie 1,07 : 1.
Dieser Umstand deutet darauf hin, daß nur die klinische Manifestation der Otosklerose bei Frauen größer ist als bei Männern.

Die Erkrankung wird mit einer familiären Belastung von 50-58 % wahrscheinlich autosomal dominant vererbt (Nager 1939; Cawthorne 1955; Shambaugh 1959).
Neben diesem autosomal dominanten kann auch ein rezessiver Erbgang mit inkompletten Manifestationen bestehen (Zechner und Manolidis 1972; Larsson 1960 und 1963).

Die Erkrankung beruht auf einer pathologisch-anatomisch exakt definierbaren, herdförmigen oder auch diffusen, nicht entzündlichen Veränderung des Labyrinthknochens.
Nager (1939) fand normale Mittelohrschleimhaut in 69,9 % der 1146 Otosklerosefälle, Cawthorne (1955) fand sie in 84 % von seinen 310 Fällen.
Dem von Habermann (1892) angenommenen Zusammenhang der Otosklerose mit entzündlichen Veränderungen des Mittelohres wird damit weitgehend die Grundlage entzogen.

Betrifft der Knochenprozeß die Gegend des ovalen Fensters oder die der Fußplatte, so kann es zur Ankylose des Steigbügels kommen, die Valsalva schon 1735 beschrieben und Toynbee (1841) als eine der Ursachen der Schwerhörigkeit erkannt hatte.
Die histologischen Untersuchungen zeigten osteoklastische Destruktion des Knochengewebes in der Labyrinthkapsel, gefolgt von abnormen Knochenneubildungen.

Cawthorne (1955) zieht einen Vergleich zwischen Haarfarbe, bezogen auf den Bevölkerungsdurchschnitt, und das Auftreten der Otosklerose und kommt zu dem Resultat, die Otosklerose bevorzuge die blonde Bevölkerung deutlich.

Dagegen steht einwandfrei die Bevorzugung der weißen Rasse fest (Sèrcer 1961; Cawthorne 1955).
Guild (1944) berichtete, daß die histologische Otosklerose in 9,4 % der weißen Rasse; dagegen in nur 0,9 % der Neger vorkommt.
Aus Hawaii berichtete Joseph aus einer Serie von 220 Otosklerosekranken, daß die Häufigkeit dieser Erkrankung bei der weißen Rasse 2,1 mal größer als bei den Japanern.
Sèrcer (1961) brachte die Unterschiede in der Häufigkeit der Otosklerose bei der weißen und bei der pigmentierten Rasse mit der Schädelform in Zusammenhang.
Die sogenannte Schädelbasisknickung ist nämlich beim Europäer stark ausgebildet (der Winkel beträgt 114-120°), beim Asiaten und Neger schwächer (Winkel von 140°).
Je kleiner der Winkel ist, um so größer ist die Tendenz der Entwicklung histologischer Otosklerose.

Für die Entstehung der otosklerotischen Knochenneubildung werden drei Stadien unterschieden:

1. eine inaktive Vorstufe (Vorstadium)
2. eine aktive Phase (Knochenumbau) oder lytische Phase (rote Otosklerose)
3. ein inaktives Endstadium oder sklerotische Phase (weiße Otosklerose)

Die otosklerotischen Veränderungen sind bevorzugt an der Schneckenkapsel lokalisiert, besonders am ovalen Fenster, in der Gegend des runden Fensters, in basaler Schneckentreppe und an der Steigbügelfußplatte.
Die Fissula ante fenestram und post fenestram sind auch als Prädilektionsstellen für die otosklerotische Knochenbildung bekannt.
Es ist sicher kein Zufall, daß die Prädilektionsstellen der Otoskleroseherde gerade mit unruhigen Teilen (mechanisch belasteten Stellen) der Labyrinthkapsel übereinstimmen.

Im histologischen Schnitt der Felsenbeinpaaren von Otoskle-

rosekranken wurden in 31 % der Fälle sogenannte "blaue Mäntel" beobachtet (Zechner und Altmann 1972).
Die "blauen Mäntel" sind band- bzw. röhrenförmige Gebilde, bestehend aus geflechtartigem Knochen und umgebende Gefäße (Zechner und Altmann 1972), die sich bei Hämatoxylin-Eosin-Färbung als blaßblaue, wolkige Strukturen darstellen, d.h. "blaue Mäntel" sind eine histologische Anfärbbarkeit eines Geflechtknochens.
Nach MPS-Eisen-PAS-Reaktion erscheinen die "blauen Mäntel" tiefblau (PAS-Reaktion positiv), es ist ein Ausdruck des hohen Gehaltes der Grundsubstanz an Mucoproteinen und Glykoproteiden (Pearse).
Die "blauen Mäntel" sind nach Mayer, Meyer, Manasse, Weber, Greifenstein, Zechner und Altmann (1972) das Ergebnis eines Umbauvorganges in der Labyrinthkapsel des Menschen bei der Otosklerose.
Sie wurden immer wieder als Vorstufen der Otosklerose aufgefaßt.
Weber sah sie in 70 %, Nylèn wesentlich seltener in 24 % und Zechner-Altmann etwa in 31 % der Fälle.
"Mantelbildungen" treten bevorzugt in der Bogengangskapsel auf, und zwar in Höhe des runden Fensters rund um die Ampulle des hinteren Bogenganges.
Die Bogengangskapsel ist etwas anders als die Schneckenkapsel aufgebaut.
Fowler legte eine Statistik über das Zusammentreffen von Otosklerose und blauen Skleren vor.
Bei 63 Otosklerosepatienten fand er in 69 % blaue Skleren.

B.2. Mucopolysaccharidosen

Mucopolysaccharidosen sind genetisch determinierte Stoffwechselerkrankungen der sauren Mucopolysaccharide, denen eine lysosomale Enzymdefizienz zugrunde liegt (Dorfmann 1971; McKusick 1960).

Die Erkrankung wirkt sich auf das Skelettsystem aus, die vor allem durch das Auftreten von Skelettdysplasien charakterisiert ist.
Die Stoffwechselerkrankung äußert sich u.a. auch in hohen Ausscheidungsraten saurer Mucopolysaccharide im Harn und Erhöhung der sauren Mucopolysaccharide im Serum (Kaiser 1969; Luderschmidt 1979; Eto 1979; Gitzelmann 1978; Meyer 1958).
Die Mucopolysaccharidose I-H (Morbus Pfaundler Hurler) wird autosomal rezessiv vererbt (Mc Kusick 1960; Luderschmidt 1979).

Glykosaminoglykane, früher saure Mucopolysaccharide genannt, sind polyanionische Polysaccharide, die im Gewebe als Proteoglykane vorliegen.
Sie werden bei den Mucopolysaccharidosen nicht oder unvollständigt metabolisiert, intralysosomal in den verschiedenen Geweben gespeichert oder im Urin vermehrt ausgeschieden.
Man unterscheidet heute neun verschiedene Mucopolysaccharidose-Typen.
Die Mucopolysaccharidosen kommen hauptsächlich bei der weißen Rasse, selten bei Negern und Asiaten vor (Zechner und Altmann 1968; Lamon 1980; Trojak 1980).

Von besonderem Interesse ist das Vorliegen von Otoskleroseherden bei Mucopolysaccharidosen in den Nischen des ovalen und des runden Fensters ohne Stapesankylose und der Befund von zahlreichen typischen "blauen Mänteln" im Bereich der Bogengänge in streng symmetrischer Anordnung (Zechner und Altmann 1968).
Diese histo-morphologischen Befunde stimmen mit der klinisch in hohem Prozentsatz zu beobachtenden Mittelohrschwerhörigkeit bei den Mucopolysaccharidosen überein (Zechner und Manolidis 1972).
Eine Mucopolysaccharidose mit zu hohem Spiegel saurer Mucopolysaccharide - ob nun durch gesteigerte Synthese, gestörten Abbau oder auch mangelhafte Aussonderung aus den Zellen - ist nach den obigen Befunden von Zechner (1972) offenbar ein idealer Boden für die Entwicklung otosklerotischer Herde in der enchondralen Labyrinthkapsel.

8.3. Osteogenesis imperfecta

Osteogenesis imperfecta ist eine relativ ungewöhnliche, erbliche, generalisierte Bindegewebserkrankung, die sich vorwiegend auf das Skelettsystem auswirkt.
Histologisch läßt die unreife Knochenmatrix bei Osteogenesis imperfecta an "blaue Mäntel" bei Otosklerose erinnern.
Die Fragilitas ossium bei dieser Erkrankung beruht auf einer unzureichenden Aktivität der Osteoblasten, insbesondere einer Hemmung der periostalen Knochenneubildung, bei ungestörter Osteoklasie.
Bei der Osteogenesis imperfecta besteht ein Ungleichgewicht zwischen der lytischen und sklerotischen Phase zu Ungunsten der sklerotischen Phase.

Die Erkrankung wird autosomal dominant vererbt (Quisling 1979; Du Four und Bertrand 1972; Carey 1968).
Bei der Osteogenesis imperfecta werden keine Veränderungen der Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Urin gefunden (Turakainen 1980; Berggren 1969; Hurst 1980; Kaiser 1969).
Bei dieser Erkrankung wird die weiße Rasse bevorzugt (Quisling 1979).

Die charakteristischen Syndrome sind blaue Skleren, abnorme Knochenbrüchigkeit und Schalleitungsschwerhörigkeit.
Diese Trias ist unter dem Namen van der Hoeve-Syndrom bekannt.
1912 hat Adair-Dighton über das kombinierte Auftreten von Knochenbrüchigkeit und Schwerhörigkeit berichtet.
Die Verbindung der Erkrankung zu blauen Skleren und Schwerhörigkeit ist seit 1917 bekannt.

Der erste Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Osteogenesis imperfecta und Otosklerose stammt von Bronson (1917) und van der Hoeve und de Klejn (1918).
Van der Hoeve und de Klejn glaubten, daß die Schwerhörigkeit als Folge von Otosklerose sein konnte.
Bei dieser Erkrankung konnte Weber (1935) auch am Labyrinthknochen Veränderungen nachweisen.

Bei der Kallusbildung im Anschluß an eine Fraktur, beim Vorliegen einer Osteogenesis imperfecta kommt es ebenfalls zu den Bildern, die große Ähnlichkeit mit der Otosklerose aufweisen. Die seltene Erkrankung der Osteogenesis imperfecta wird häufig mit der Otosklerose zusammen beobachtet.

Hall et al. und Wullstein studierten die mögliche Verwandtschaft zwischen Osteogenesis imperfecta und Otosklerose. Sie kamen zu der Auffassung, daß Otosklerose sich wie eine lokalisierte Form von Osteogenesis imperfecta darstellt. Der Unterschied liegt in familiärer Belastung (50-58 % bei der Otosklerose zu 70-75 % bei Osteogenesis imperfecta), Ausdehnung und Lokalisation.
Bei der Osteogenesis imperfecta von Hall wurden otosklerotische Veränderungen in der Labyrinthkapsel in 40 bis 60 % der Fälle beschrieben und als Spätform der Osteogenesis imperfecta angesprochen.

B.4. Morbus Paget

Morbus Paget ist eine autosomal dominant erbliche Skelett-erkrankung, die auf einer Veränderung der Osteoklastenfunktion und darausfolgender vermehrter Knochenresorption beruht (Siris 1980; Ryan 1977; Ringe 1979; Mc Kusick 1972; Singer 1977).

Die Ausscheidung der sauren Mucopolysaccharide im Urin ist bei dieser Erkrankung unverändert (Kaiser 1969).
Geographische Untersuchungen ergaben, daß die Morbiditätsrate bei der weißen Rasse gegenüber anderer Rasse höher liegt (Collins 1956; Ryan 1977; Barry 1969).
Die Erkrankung verläuft in der Regel langsam und teilt sich in lytischer und sklerotischer Phase.

Topographisch unterscheidet man eine monostotische und eine polyostotische Form, wobei bei der polyostotischen Form die statisch-mechanisch belasteten Knochen besonders bevorzugt sind.

Eine Paget-Manifestation wird durch vermehrte mechanische Belastung eines Knochens begünstigt (Uehlinger 1979).
Bei Morbus Paget können sich die Veränderungen im Felsenbein manifestieren mit dem Ergebnis einer Stapesfixation.
Ringe (1979) behauptete, bei Morbus Paget mit Schädelmanifestation tritt in 28 % der Fälle Schwerhörigkeit auf.

Tbl. 2: Vergleiche zwischen der Otosklerose (OS) und otosklerose-ähnlichen Erkrankungen, wie Morbus Paget (MP); Osteogenesis imperfecta (OI); Morbus Pfaundler Hurler (MPH).

	GENETIK	
	Rassische Verteilung	Familiär
OS	Weiße Rasse bevorzugt, bei Negern und Asiaten seltener (Cawthorne 1955; Sèrcer 1961; Guild 1944).	Belastung von 50-58 %. Autosomal dominant, aber auch ein rezessiver Erbgang mit inkompletten Manifestationen (Zechner und Manolidis 1972; Larsson 1960 und 1963; Nager 1947; Denker 1904).
MP	Weiße Rasse häufiger, bei Negern und Asiaten selten (Collins 1956; Barry 1969).	Belastung von 15-30 %. Autosomal dominant (Siris 1980; Mc Kusick 1972; Ryan 1977).
OI	Weiße Rasse bevorzugt (Quisling 1979).	Belastung von 75 %. Autosomal dominant (Quisling 1979; Du Four und Bertrand 1972; Carey 1968).
MPH	Weiße Rasse hauptsächlich, seltenes Vorkommen bei Negern und Asiaten (Zechner und Altmann 1968; Lamon 1980; Trojak 1980).	Autosomal rezessiv (Mc Kusick 1980; Luderschmidt 1979).

CHEMIE DES URINS

OS Soifer: Saure Mucopolysaccharide unverändert (siehe Tbl. 1).
Zechner: Saure Mucopolysaccharide erhöht bei florider Otosklerose; unverändert bei inaktiver Otosklerose.

MP Saure Mucopolysaccharide unverändert (siehe Seite 11).

OI Saure Mucopolysaccharide unverändert (siehe Seite 10).

MPH Saure Mucopolysaccharide erhöht (siehe Seite 9).

VERLAUF

OS In der Regel langsam
2 Phasen: otospongiöse (lytische) und otosklerotische Phasen (Beickert 1965).

MP sehr langsam
2 Phasen: lytische und sklerotische Phasen (Siris 1980; Barry 1969).

OI O.I. Congenita: sehr rasch
O.I. Tarda: langsam (Quisling 1979)

MPH Relativ schnell (Luderschmidt 1979).

TOPOGRAPHIE

OS Bevorzugt an der Schneckenkapsel (mechanisch belasteten Stelle) - (Zechner und Manolidis 1972; Zechner und Altmann 1972).

MP Monostotisch: vereinzelter Befall
Polyostotisch: generalisierter Befall, wobei statisch-mechanisch belastete Knochen besonders bevorzugt (Barry 1969; Siris 1980; Ringe '79)

OI Monostotisch: vereinzelter Befall
Polyostotisch: generalisierter Befall, wobei lange Röhrenknochen (statisch belastete Knochen) besonders bevorzugt (Quisling 1979).

MPH Generalisiert am Skelett (Zechner und Altmann 1968).

BEGLEITERSCHEINUNG

OS Blaue Skleren in 69 % der Fälle (Fowler 1949).

MP Schwerhörigkeit in 28 % der Fälle bei Schädelmanifestation (Ringe 1979).

OI Blaue Skleren in 56 % der Fälle und Schwerhörigkeit in 36 % der Fälle (Adair-Dighton 1912; van der Hoeve und de Kleyn 1918).

MPH Schwerhörigkeit (Zechner und Altmann 1968).

Anmerkung: OS = Otosklerose
MP = Morbus Paget
OI = Osteogenesis imperfecta
MPH = Morbus Pfaundler Hurler

B.5. Ätiologie der Otosklerose

Insgesamt tragen vermutlich mehrere Ursachen zur Entstehung der Otosklerose bei.

1. Biochemische Faktoren
   - wie Störungen im Hormonhaushalt (z.B. Östrogen und Calcitonin) mit ihrer Auswirkung auf den Knochenstoffwechsel und Aktivierung ihrer Osteozyten
   - pH-Verschiebung durch Überbelastung oder entzündliche Prozesse etc.
2. Anatomische und mechanische Faktoren; die hier weniger interessant sind

B.5.1. Biochemische Faktoren

Die Beobachtung über das Auftreten, die Verstärkung oder den Stillstand der otosklerotisch bedingten Störungen in Zeiten hormoneller Umstellungen (Pubertät, Schwangerschaft, Menopause) geben Anlaß zur Annahme, daß die Entstehung oder Entwicklung der Otosklerose auch mittelbar mit dem Östrogenstoffwechsel in Verbindung steht (Tarasenkova 1967; Seifert 1937; Puhakka 1971).
Hormonelle Veränderungen gelten als allgemein aktivierender Faktor für die Entwicklung der Otosklerose (Seifert 1937; Fowler 1948).

Der verschlimmernde Einfluß der Gravidität ist ein Hinweis auf endokrine Faktoren (Nylén und Nylén 1952).
Die hohe Östrogenkonzentration erklärt die Verschlechterung der Schwerhörigkeit in der Schwangerschaft (Vyslonzil 1961).

Die Beobachtung, daß gynäkologisch indizierte Östrogenbehandlung bei weiblichen Otosklerosepatienten zu einer merkbaren, nach Absetzen der Therapie reversiblen Hörverschlechterung führte, brachten Vyslonzil und Klein auf den Gedanken, bei

Männern, die an einer operativ bestätigten Otosklerose litten, quantitative Hormonbestimmungen anzustellen.
Es ergab sich bei diesen Untersuchungen in 85 % der Fälle eine absolute, in 15 % der Fälle eine relative Östrogenvermehrung.

Über den Einfluß oraler Kontrazeptiva sind die Meinungen geteilt. Die Hälfte der Beteiligten an einem Rundtischgespräch zu diesem Thema in Chicago 1977 vertrat die Ansicht, daß sich die Symptome der Otosklerose durch Einnahme von Ovulationshemmern verstärken.
Plester kommentiert dieses mit der Anmerkung, daß ein negativer Einfluß bis 1979 nicht erwiesen ist.

B.5.2. Anatomische und mechanische Faktoren

Shambaugh nimmt an, daß Größe und Form der Fissula ante fenestram zweifellos hereditär determiniert seien, und erklärt damit die erbliche und rassische Tendenz der Otosklerose.
Dies erscheint jedoch nur dann stichhaltig, wenn nachgewiesen wäre, daß die Fissula bei den verschiedenen Rassen tatsächlich verschieden stark ausgebildet ist.

Für die Japaner konnte Kirikae jedenfalls stets eine ausgeprägte Fissula ante fenestram histologisch feststellen und er glaubt deshalb, daß bei dem relativ seltenen Vorkommen der Otosklerose in Japan zwischen der Fissula ante fenestram als solcher allein und der Entwicklung der Otosklerose keine besondere Beziehung bestehen könne.

Man muß für die Entstehung der Otosklerose mechanische Faktoren, wie Druck-, Zug- und Schereffekten, eine ursächliche Bedeutung beimessen.
Siebenmann und später Brühl sowie Gray haben die Bedeutung des mechanischen Moments für die Entwicklung der Otosklerose zum Ausdruck gebracht.
Durch die besonderen Verhältnisse im vorderen Bereich des ovalen Fensters (Otosklerosewinkel), durch die Bewegung des

Stapes, die Bewegung des Musculus tympanicus, die Belastung des Karotispulses, würde ein ständiger Reiz auf den Knochen ausgeübt, der für die Entstehung des otosklerotischen Knochens mitverantwortlich sei.
Gray nimmt an, daß auch in der Labyrinthkapsel, nahe den Fenstern, eine besondere Belastung und Beanspruchung des Knochens gegeben wäre.
O. Mayer sah die Ursache in der besonderen statistisch-mechanischen Beanspruchung des Labyrinthknochens.

Daß die Labyrinthkapsel keineswegs, wie früher angenommen wurde, aus dem Spannungsfeld des Schädels ausgespart war, sondern tatsächlich Belastungen erfährt, haben Loebell und Nauck nachgewiesen.

In der Annahme, daß biochemische Faktoren eine maßgebende Rolle spielen, werden anhand einer umfangsreichen Stichprobe die Konzentration der sauren Mucopolysaccharide im Serum und Urin bestimmt.

B.6. Saure Mucopolysaccharide

Saure Mucopolysaccharide (Glykosaminoglykane) kommen weitverbreitet vor als Strukturelemente von Stütz- und Bindegewebe sowie als funktionell wichtiges Element zur Regulierung des Wasserhaushaltes (Rapoport).
Sie sind eigenschaftsbestimmend für die mechanische Beanspruchbarkeit der Grundsubstanz insofern, als Quellbarkeit, Elastizität und Viskosität in hohem Maße von ihnen abhängen.
Hervorzuheben ist außerdem die Bedeutung der sauren Mucopolysaccharide für die sich im extrazellulären Raum vollziehende Bildung von Kollagenfibrillen aus dem Pro- bzw. Tropokollagen einerseits und für die Fibrillenstabilität andererseits, die zum Teil durch den Einbau geringer Mengen saurer Mucopolysaccharide wesentlich erhöht wird.

Als Hauptvertreter der sauren Mucopolysaccharide im Stützge-

webe sind nach Kyselka und Schramm jetzt bekannt: Hyaluronsäure, Heparitinsulfat (Heparansulfat), Chondroitinsulfat A und C, Chondroitinsulfat B (Dermatansulfat) und Keratosulfat (Keratansulfat).
Chemisch zeichnen sich die sauren Mucopolysaccharide dadurch aus, daß sie N-acetyliertes Glucosamin (z.B. Hyaluronsäure) oder N-acetyliertes Galaktosamin (z.B. Chondroitin) in sulfatierter oder nicht sulfatierter Form und Glucuronsäure enthalten, nur beim Keratosulfat tritt an Stelle der Glucuronsäure die Galaktose.

Durch die Glucuronsäuren und die Schwefelsäurereste sind die Stoffe stark sauer (Zit. nach Karlson).

B.6.1. Hyaluronsäure

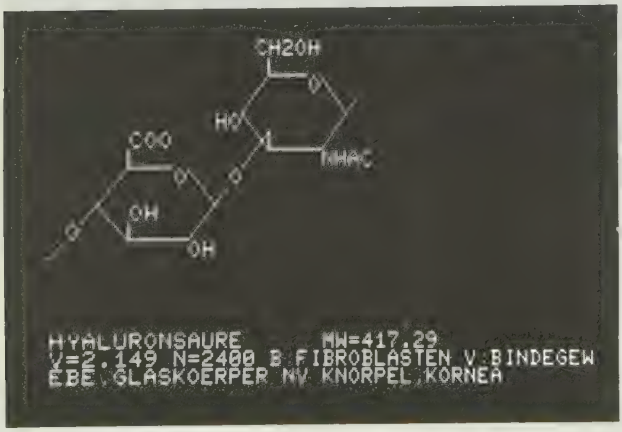


Abb. 1: Hyaluronsäure

Die Hyaluronsäure besitzt ein Molekulargewicht von über einer

Million.
Die biologische Funktion der Hyaluronsäure als Bestandteil des Reusensystems im Bindegewebe besteht darin, daß sie die freie Bewegung größerer Teilchen verhindert.
Hyaluronsäurelösungen zeigen auch die Eigenschaften eines Gleitmittels.
Das stimmt mit dem Vorkommen der Hyaluronsäure in der Gelenkflüssigkeit überein.

B.6.2. Chondroitinsulfat

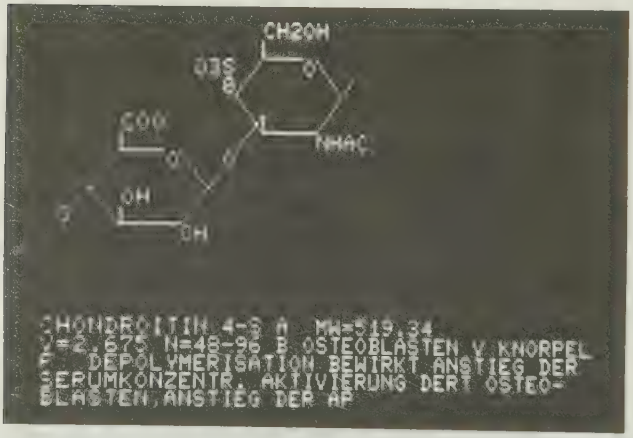


Abb. 2: Chondroitin-4-sulfat (A)
Molekulargewicht 25.000-50.000

Als Chondroitin wird eine der Hyaluronsäure ähnliche Verbindung bezeichnet, die statt Glucosamin Galaktosamin enthält.
Die Chondroitinsulfate (Fischer und Boedecker 1863; Krukenberg 1884) bilden den Hauptbestandteil des Knorpelgewebes, an

dessen Trockenmasse sie mit bis zu 40 % beteiligt sind.
Sie kommen jedoch ganz allgemein in allen Schütz-, Stütz- und Bindegeweben vor.
Chondroitinsulfate bestehen aus unverzweigten Ketten, die N-Acetylgalaktosamin, Glucuronsäure und Sulfatreste enthalten. Nach ihren chemischen Eigenschaften unterscheidet man verschiedene Chondroitinsulfate (A, B, C).

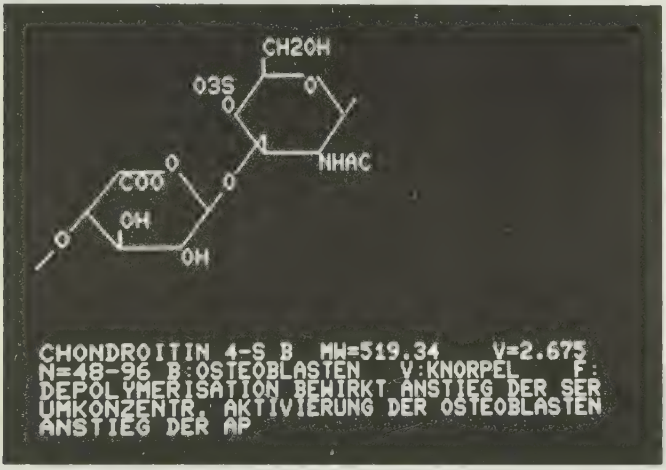


Abb. 3: Chondroitinsulfat B
Molekulargewicht 25.000-35.000

Chondroitinsulfat B (Dermatansulfat) enthält anstelle der Glucuronsäure die stereoisomere Iduronsäure.

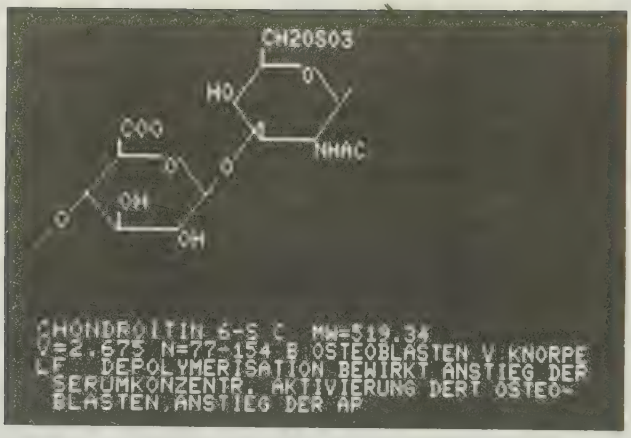


Abb. 4: Chondroitin-6-sulfat (C)
Molekulargewicht 40.000-80.000

Das Molekulargewicht der Chondroitinsulfate beträgt zwischen 25.000-80.000.
Diese Substanzen liegen in den Geweben in einer festen Verbindung mit Eiweißen als Proteoglykane vor.
Die Verbindung erfolgt durch eine glykosidische Bindung mit der Hydroxylgruppe des Serins der Eiweiße durch eine charakteristische Trisaccharideinheit, an der Xylose und Galaktose beteiligt sind (Ser-Xyl-Gal-Gal-).
Für die Knochenneubildung ist die Erzeugung der organischen Grundsubstanz mit Kollagen und Chondroitinsulfat notwendig.

B.6.3. Keratansulfat

Dieses Polysaccharid, dessen Bestandteile N-Acetylglucosamin, Galaktose und Sulfat sind, ist ein wichtiger Bestandteil des

Knorpels.
Aufbau und Bindungsweise sind analog dem Chondroitinsulfat, mit dem Unterschied, daß die Stelle der Glucuronsäure von der Galaktose eingenommen wird.
Sowohl Chondroitinsulfat wie Keratansulfat sind an dieselbe Peptidkette kovalent gebunden und bilden auf diese Weise die Elementareinheit der Grundsubstanz des Knorpels.

Die Glykosaminoglykane weisen eine unterschiedliche Umsatzgeschwindigkeit auf, je nach ihrer chemischen Natur und dem Gewebe, in dem sie vorkommen.
So ist die biologische Halbwertszeit der Hyaluronsäure der Haut nur etwa 5 Tage und die des Chondroitinsulfates im Knorpel etwa 30 Tage.
Die Erneuerungsgeschwindigkeit des Keratansulfates ist in den Zwischenwirbelscheiben sehr gering und beträgt über 120 Tage (Rapoport).

8.6.4. Heparin

Heparin ist ein Polysaccharid vom Molekulargewicht 10.000-16.000, das aus Sulfonylaminoglucose (Glucosamin-N-Schwefelsäure) und Schwefelsäureestern der Glucuronsäure aufgebaut ist.
Als Verknüpfungsart wurde neuerdings die 1-4-1-4-Bindung ermittelt; damit ist das Heparin anders aufgebaut als die Chondroitinsulfate.
Der Gehalt an Schwefelsäure ist recht hoch, er entspricht 4-5 Molekülen pro Tetrasaccharideinheit (Zit. nach Karlson).
Heparin ist in seinem Stoffwechsel den anderen Glykosaminoglykanen ähnlich.

Es ist in den Mastzellen enthalten.

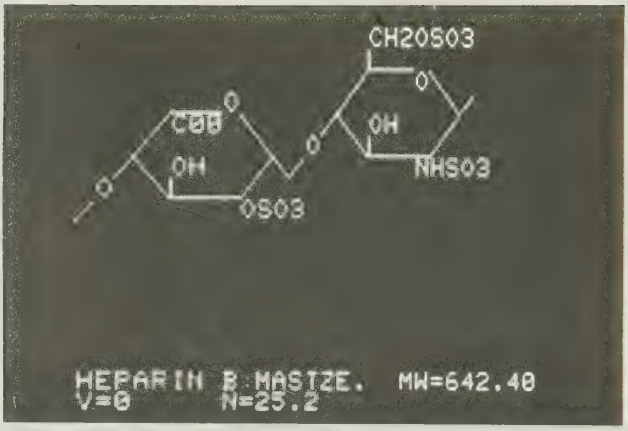


Abb. 5: Heparin
Molekulargewicht 10.000-16.000

Die Synthese der sauren Mucopolysaccharide erfolgt intrazellulär am Golgiapparat, zum Teil auch am endoplasmatischen Retikulum.
Hierbei ist zumindest bei den sulfathaltigen sauren Mucopolysacchariden eine Proteinsynthese an den Ribosomen vorgeschaltet, der sich dann - verbunden mit dem aufgebauten Protein - die saure Mucopolysaccharid-Synthese anschließt.
Die Halbwertszeiten der sauren Mucopolysaccharide sind relativ niedrig.

Über die Nieren werden normalerweise relativ konstante Mengen un- oder wenig veränderte saure Mucopolysaccharide ausgeschieden (Kaiser 1969).
Diese Restmengen können im Urin als Heparansulfat, Chondroitinsulfat A und C sowie Dermatansulfat qualitativ nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden.
Die dabei gewonnenen Verteilungsmuster zeigen ein charakteristisches Bild, bei dem Chondroitinsulfat A/C den Haupt-

bestandteil der Ausscheidung ausmacht.
Treten bei einer globalen Bestimmung der sauren Mucopolysaccharide wesentliche quantitative Veränderungen auf, so kann man mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Störung im sauren Mucopolysaccharide-Stoffwechsel schließen, jedoch manifestieren sich die quantitativen Veränderungen nicht an allen sauren Mucopolysacchariden gleichmäßig, sondern verschiedene Fraktionen können hierbei besonders betroffen werden.

Es ist durchaus möglich, daß die globale Bestimmung der gesamten sauren Mucopolysaccharide normale Werte ergibt und lediglich das quantitative Verhältnis der einzelnen sauren Mucopolysaccharide-Fraktion zueinander (Verteilungsmuster) verschoben ist.
So bietet die globale und differenzierte Analyse der sauren Mucopolysaccharide im Urin ein wertvolles Mittel, korrespondierende Auskünfte über einen normalen oder gestörten Stoffwechsel der sauren Mucopolysaccharide zu erhalten.

8.7. Glykoproteine

Die Glykoproteine sind nach einem anderen Prinzip aufgebaut als die eben besprochenen sauren Mucopolysaccharide.
Rückgrat des Makromoleküls ist hier eine Polypeptidkette, also ein Proteinmolekül.
Diese Glykoproteine verhalten sich ähnlich wie Proteine; ihr Kohlenhydratanteil beträgt meist 10-25 %.
Eine Ausnahme macht das besonders kohlenhydratreiche saure α_1-Glykoprotein (früher Orosomucoid genannt, Molekulargewicht 45.000) mit 41,4 % Kohlenhydratanteil.
Der Kohlenhydratanteil liegt in Form von Oligosaccharidseitenketten vor.
Als Verknüpfungsart hat man O-Glykoside mit Hydroxylgruppen des Serins und Threonins und N-glykosidische Bindungen mit den Amidgruppen des Asparagins nachgewiesen.

Die meisten Proteine der Globulinfraktion sind eigentlich Glykoproteine (siehe Tbl. 3).
Manche dieser Glykoproteine haben spezifische Bindungsfunktionen.
Mit sauren Mucopolysacchariden verwandt sind Glykoproteide, die Hexosen, Hexosamine, Fucose und vereinzelt Neuraminsäure enthalten; womit sie ähnlich mit Polykationen zu reagieren vermögen.

Ein gemeinsames Merkmal dieser Polyanionen ist die Bildung schwerlöslicher Verbindungen mit Polykationen oder kationischen Detergenzien (z.B. Cetyltrimethylammoniumchlorid), die zum Nachweis herangezogen werden können.
Auch Proteine vermögen Addukte zu bilden, sofern sie nur über eine entsprechende Anzahl saurer Gruppen verfügen (Glutaminsäure, Asparaginsäure) und das Milieu den entsprechenden niedrigen pH-Wert aufweist.

Im Bereich hoher pH-Werte (∽8) bilden praktisch alle Proteine unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt Addukten.
Erinnert sei in diesem Zusammenhang an die Rivanol-Fällung der Proteine im schwach alkalischen Bereich.

C. METHODE

Zum Nachweis der sauren Mucopolysaccharide und sauren Glykoproteide sind die neutralen Proteine nach Möglichkeit vorher abzutrennen, da ihr Nachweis unspezifisch ist.
Die Abtrennung der neutralen Proteine kann erfolgen durch:

1. Ausfällung nach Hitzedenaturierung
   oder
2. Extraktion mit Phenol

C.1. Ausfällung nach Hitzedenaturierung

Aufgrund vorliegender Tabelle nach H.E. Schultze werden Glykoproteine und saure Glykoproteine ebenso wie die sauren Mucopolysaccharide nicht präzipitiert.

Eiweiß	Hitzefällung	pH	Kohlenhydratgehalt
Albumin	+	5	0,08 %
Präalbumin	+	5	0,5 %
α_1-Lipoprotein	+	5	1,5 %
α_1-SAURES-GLYKOPROTEIN	-	5	41,4 %
α-Antitrypsin	+	5	12,4 %
α_1-leicht präzipitierbares Glykoprotein	+	5	13,3 %
TRYPSINARMES-α_1-GLYKOPROTEIN	-	5	13,7 %
Globulin	+	5	4,2 %
α_1-x-GLYKOPROTEIN	-	5	22,7 %
HAPTOGLOBIN	-	5	19,5 %
Ceruloplasma	+	5	8 %
α_2-HS-Glykoprotein	+	5	13,4 %
SAURES-α_1-GLYKOPROTEIN	-	5	42,6 %

Eiweiß	Hitzefällung	pH	Kohlenhydratgehalt
Transferrin	+	5	5,8 %
β-2β-Globulin	+	5	3,03 %
HEMOPEXIN	-	5	22,6 %
α_1-GLYKOPROTEIN	-	5	17,1 %
γ-Immunoglobulin	+	5	2,9 %
γ-M-Immunoglobulin	+	5	11,8 %
γ-A-Immunoglobulin	+	5	7,52 %

Tbl. 3: Plasmaeiweiße nach H.E. Schultze.

C.2. Extraktion mit Phenol

Es ist seit langem bekannt, daß Phenol ein ausgezeichnetes Lösungsmittel für Proteine ist.
Diese Tatsache wurde von Morgan (1941) ausgenutzt, um Polysaccharid-Protein-Komplexe zu zerlegen und die Polysaccharidkomponente sowie das sog. "simple Protein" zu isolieren.
Dabei gehen die Proteine fast komplett (98 %) in die Phenolphase über.

Später konnten Westphal et al. zeigen, daß durch die Behandlung von Bakterien mit Phenol-Wasser-Gemischen entweder bei Raumtemperatur oder besser erst in homogener Phase (über 65° C) nach Trennung der Schichten in der wäßrigen Phase die Lipopolysaccharide zusammen mit Nucleinsäure anfallen; während Proteine der Bakterien aus der Phenolphase in zum Teil fast nicht denaturierter Form isoliert werden.

So kann z.B. Virus RNAase weitgehend rekonstituiert werden (siehe unten).
Die sauren Mucopolysaccharide sind durch ihre Sulfat- oder Carboxylgruppen stark polar, so daß sie im ebenfalls polaren Lösungsmittel gut löslich sind.
Die Verteilung der sauren Mucopolysaccharide zwischen den zwei

verschiedenen polaren Phasen - Phenol (ε = 9,98) und Wasser (ε = 80,37) - liegt zugunsten des Wassers; bei den neutralen Proteinen hingegen sind die Verhältnisse umgekehrt (Verteilungskoeffizient cPhenol/cWasser ≈ 40).
Ein ähnlicher Wert wurde von Kickhöfen (1962) und Morgan (1941) bei RNAase gefunden, die sich zu 98-99 % im Phenol befindet, was einem Verteilungskoeffizienten (K = cPhenol/cPuffer) zwischen 49 und 99 entspricht.
Die Ribonucleinsäuren, Heparin und Heparinoide, Chondroitinsulfat usw. verbleiben in der wäßrigen Lösung.

C.2.1. Metachromasie

Die polaren Eigenschaften der Sulfat- und Carboxylreste saurer Mucopolysaccharide, wie auch saurer Glykoproteide sind die Ursache ihrer spezifischen histologischen Anfärbbarkeit (Metachromasie verschiedener Farbstoffe).
Metachromasie ist eine Veränderung der Lichtabsorption als Folge einer spezifischen Salzbildung dieser Substanzen mit kationischen Farbstoffen.
Die Ursache für dieses Verhalten sind verschiedenartig.
Sie beruhen zum Teil auf Aggregation dieser Salze, zum Teil auch auf Indikatoreigenschaften der Farbstoffe.

C.3. Volumenverschiebung bei der Extraktion mit Phenol

Wasser ist mit Phenol nur beschränkt mischbar (siehe Mischungslücke des Löslichkeitsdiagramms des Systems Phenol-Wasser).
Danach ergibt sich folgendes:

Temperatur	Phenolphase	Wasserphase
10° C	73% Phenol + 27% Wasser	92 % Wasser + 8 % Phenol
20° C	71% Phenol + 29% Wasser	91,5% Wasser + 8,5% Phenol
30° C	68% Phenol + 32% Wasser	91 % Wasser + 9 % Phenol

Mischt man bei 30° C Wasser mit Phenol im Verhältnis 1:1

zusammen, so zerfällt das Gemisch in ein zwei Phasensystem. Es bilden sich zwei gesättigte Lösungen.
In der Regel wird die Mischungslücke, wie es Abb. 6 andeutet, mit steigender Temperatur kleiner; die beiden gesättigten Lösungen werden daher einander immer ähnlicher; schließlich wird ein Punkt K erreicht, bei dem der Unterschied ganz verschwindet, oberhalb dessen also nur eine Phase existenzfähig ist.

Der Punkt K der Abb. 6 entspricht offenbar dem kritischen Punkt des Zustandsdiagrammes reiner Stoffe; man bezeichnet ihn daher gelegentlich als oberen kritischen Lösungspunkt.

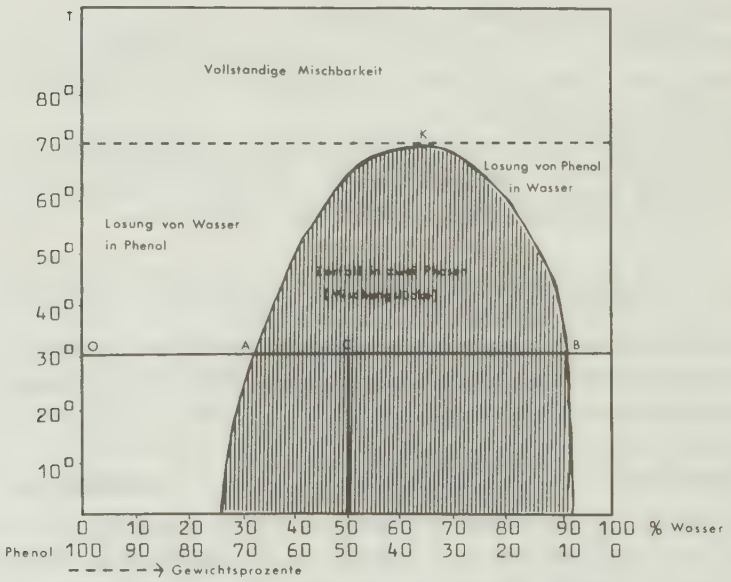


Abb. 6: Löslichkeitsdiagramm des Systems Phenol-Wasser.

Da Phenol gemäß dem Löslichkeitsdiagramm (Abb. 6) beträchtliche Mengen Wasser aufnimmt - und auch umgekehrt - und zu dem das dem Wasser vergleichbare spezifische Gewicht des Phenols ($1{,}072\ g/cm^3$), wird dadurch eine rasche Trennung der Phasen im Zentrifugalfeld erschwert.

Wird das Phenol-Wasser-Gemisch unter Normalbedingungen zentrifugiert, so erwärmt sich das Zentrifugat.
Beim Herausnehmen kühlt sich das Zentrifugat wieder ab, es kommt jetzt nach dieser Trennung in beiden Phasen zu einer Trübung.
Die Trübung kommt durch eine Entmischung zustande, weil das aus der Wasserphase ausgeschiedene Phenol (gegebenenfalls mit neutralen Proteinen) sedimentiert und das aus der Phenolphase ausgeschiedene Wasser (gegebenenfalls mit sauren Mucopolysacchariden) nach oben steigt.

Wird die Wasserphase rasch abgesaugt und sogleich ausgeäthert, so geht Phenol mit gelösten Proteinen in die Ätherphase über; wobei das Protein als gallertartige Masse ausfällt, die sich langsam wieder in Wasser lösen kann und bei der nachfolgenden unspezifischen Bestimmung zu erhöhten Werten führt.
Aus diesem Grund wird die Wasserphase vorsichtig und rasch unten abgesaugt und von der gallertartigen Proteinmasse getrennt.

Die Extraktion mit Phenol ist gegenüber der Hitzedenaturierung zu bevorzugen, weil

1. Saure Mucopolysaccharide oder saure Proteine nicht mitgerissen werden
2. Die Methode spezifischer ist, d.h. bessere Separation saurer und neutraler Substanzen
3. Die Extraktion leichter variiert werden kann (z.B. durch die Änderung von pH, Temperatur).

C.3.1. Verteilungskinetik

Das Verteilungsgleichgewicht stellt sich innerhalb sehr kurzer Zeit ein.
Bereits nach 10 Minuten Schütteln ist keine Veränderung mehr zu erwarten, wie spektrometrische Messungen zeigen.

C.4. Nachweis saurer Mucopolysaccharide und saurer Glykoproteide im Urin

Allgemein

Saure Mucopolysaccharide und saure Glykoproteide können wie Seite 26 schon bereits erwähnt, mit kationischen Detergenzien wie Cetyltrimethylammoniumchlorid, Cetavlon und mit Polykationen wie Polybrene, Toluidinblau und Alcianblau gefällt werden.

Die Bestimmungsmethode der sauren Mucopolysaccharide und sauren Glykoproteide wird wie folgt aufgelistet:
Die zugehörigen Literaturen:

1. Kaiser und Kyselka
2. Yamamoto
3. Rufini
4. Eto
5. Hilborn
6. Burlingame
7. Soifer
8. DiFerrante und Rich

Tbl. 4: Die häufig angewendete Methode zur Fällung saurer Mucopolysaccharide und saurer Glykoproteide.

Autor	Urinmenge	Vorreinigung bzw. Vortrennung	Reaktionsansatz	RZ	RT	Messung	Eichsubstanz
1	50 ml (24 Std.Urin)	a. Dialyse (48 Std.)	2 ml Urin + 2 ml 0,01 % Tb.	15'	RT	Nach Trennung des Präzipitats	Chondroitin-sulfat
		b. Fällung mit CTAB (100 ml Urin + 1 ml 10 %). Digestion mit Papain, Dialyse, Umfällung.			RT	Hexuronsäure mit Carbazol-Methode nach Dische. Hexosamin nach Elson-Morgan.	Glucuron-säure Glucosamin
2	24 Std. Urin	Fällung mit CTAB (100 ml Urin + 1 ml 10 %), Umfällung		48 h	RT	wie 1b	wie 1b
3	24 Std. Urin	Elektrophorese	0,25 % Ab in NaOH:HAc:H_2O = 50 : 5 : 45	5'	RT		Chondroitin-sulfat Hyaluron-säure
4	24 Std. Urin	a. Elektrophorese	0,2 % Tb		RT		wie 3
		b. Fällung mit CPC (100 ml Urin + 1 ml 5 %)			RT	Hexuronsäure mit Carbazol-Methode nach Dische.	Glucuron-säure

Autor	Urinmenge	Vorreinigung bzw. Vortrennung	Reaktionsansatz	RZ	RT	Messung	Eichsubstanz
5	24 Std. Urin	Elektrophorese	0,5 % Ab in 3 % HAc		RT		wie 3
6	24 Std. Urin	48 h Dialyse, lyophilisiert; 100 ul aufgegeben zur Elektrophorese.	1 % Ab in HAc : H_2O = 1 : 1000	10'	RT		wie 3
7	50 ml (24 Std. Urin)	Fällung mit CTAB (30 ml Urin + 1 ml 2,5 %), 12 h belassen zentrifugiert, mit Äthanol gewaschen.		10'	RT	wie 4b	wie 4b
8	30 ml (24 Std. Urin)	wie 7		15'	RT	wie 4b	wie 4b

Anmerkung: Tb = Toluidinblau
CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid
Ab = Alcianblau
CPC = Cetylpyridimiumchlorid
RZ = Reaktionszeit
RT = Reaktionstemp. bzw. Raumtemp.
HAc = Eisessig

C.5. Eigenes Verfahren

Für die hier durchgeführten Untersuchungen wurden folgende Verfahren angewendet.

C.5.1. Probenvorbereitung

a. Serum

9 ml venöses Blut + 1 ml Zitrat werden mit einer Einmalspritze entnommen, zentrifugiert und bei - 20° C bis zur Untersuchung verschlossen (maximal 1 Woche) aufbewahrt.

b. Urin

Morgenurin wird erhitzt, danach 10 Minuten bei 6000 U/min. zentrifugiert.
Der klare Überstand wird wie Serum aufbewahrt.
oder
Ohne Erhitzen wird der Morgenurin nach Zentrifugation eingefroren.

C.5.2. Abtrennung störender Proteine

a. Serum

Extraktion mit Phenol

b. Urin

Soweit nicht durch Hitzedenaturierung bereits geschehen wird der Urin wie Serum aufbereitet.

Vom Prinzip her können Serumproteine auch durch Hitzedenaturierung gefällt werden.
Hierbei treten zwei Schwierigkeiten auf:

1. Der Einschluß oder die Mitfällung saurer Mucopolysaccharide und saurer Glykoproteide durch Proteinkomplexe

2. Die Abtrennung des Serumwassers, das saure Mucopolysaccharide und saure Glykoproteide enthält, von den präzipitierten neutralen Proteinen

Eine Trennung ist nur in Zentrifugalfeldern über 1E5 G möglich.
Erleichtert wird die Trennung durch Zugabe von Silikonöl, das

a. sich zum Austarieren eignet und
b. offensichtlich das Serumwasser aus dem gefällten Protein auspresst.

Dazu wird das Gemisch mit Silikonöl versetzt und bei 180.000 U/min. für 20 Minuten zentrifugiert.
Diese Methode wurde wegen 1. nicht angewendet.

C.5.3. Eiweißextraktion mit Phenol

Verfahren

3 ml Zitrat-Serum (Eppendorfpipette) + 5,5 ml Phenol-Wasser-Emulsion bestehend aus 53,6 % Phenol und 46,4 % Wasser (Gesamtverhältnis Serum: Wasser: Phenol = 1: 1,064: 1,121).
Wichtig ist ein intensives Schütteln.
In der ersten Untersuchungsphase wurde es 2 Minuten intensiv mit der Hand geschüttelt, dann blieb die Mischung 24 Std. bei Raumtemperatur stehen.

Da sich das Verteilungsgleichgewicht rasch einstellt, genügt ein kurzzeitiges Schütteln.
Die Menge des in die wäßrige Phase übergegangenen Proteins nimmt nach 10 Minuten Schütteln nicht mehr zu.

Danach wurde die Mischung 20 Minuten bei 6000 U/min. abzentrifugiert.
Hierbei wurden die Proben leicht erwärmt, wodurch das gegenseitige Lösungsvermögen anstieg.

Um die Probentemperatur niedrig zu halten, können die Zentrifugationszeit verkürzt und die Proben vorgekühlt werden.
Wird unter Normalbedingungen abzentrifugiert, erwärmt sich das zwei phasige System, so daß es beim Abkühlen in der Regel zur Entmischung kommt.
Durch entsprechendes Vorkühlen oder durch den Gebrauch einer Kühlzentrifuge läßt sich dies vermeiden.

Die Deckschicht - bestehend aus rechnerisch 4,314 ml wäßriger Phase - wurde zunächst soweit als möglich abgetrennt.
Zweckmäßiger erscheint jedoch die Phenolphase und die untere Schicht der Wasserphase unten abzusaugen und zu verwerfen.
Zur abgetrennten Phase wurde 5 ml Diäthyläther zugegeben, geschüttelt und 10 Minuten bei 6000 U/min. zentrifugiert.

Die nun untere wäßrige Phase (wie oben genannt 4,314 ml) verringert sich um die Menge Wasser, die sich in Äther löst und um die Menge Phenol, die in die Ätherphase übergeht; sie vermehrt sich jedoch durch die Aufnahme von etwas Äther.

Phenol geht mit angelagerten Proteinen in die Ätherphase über, wobei das Protein sich als gelartige Masse ausfällt und rasch sedimentiert (≈ 5 %).
Das nach Morgan (1941) nahezu nicht denaturierte Protein kann langsam wieder in die wäßrige Phase übergehen, deshalb wird diese unmittelbar nach der Zentrifugation unten abgesaugt, wobei die Ätherschicht belassen werden kann.
Auf die zweite Extraktion kann in der Regel verzichtet werden.

Die wäßrige Phase - rechnerisch 4,314 ml - 0,42 ml (8,9 % Phenol) - enthält geringe Menge Diäthyläther.
Der Diäthyläther löst 1,3 % (g/g) oder 1,8 Vol % Wasser, d.h. es gehen 0,09 ml Wasser in die Ätherphase über.

Damit werden die wasserlöslichen Komponenten weiter angereichert.

Dies bedeutet letztlich, daß Standard- wie Probelösungen nur nach demselben Verfahren hergestellt werden können.
Wasser löst 6,9 % (g/g) oder 9,25 Vol % Diäthyläther.
Die jetzt gelösten 9,25 Vol % Diäthyläther müssen vor dem weiteren Verlauf durch Erhitzen im Wasserbad entfernt werden - Kp von Diäthyläther = 34-35° C - (Lösemittel Hoechst).

Nach dem Abdunsten von Diäthyläther kann die Probelösung mit Toluidinblau oder einem anderen Reagenz versetzt werden.

C.5.4. Eiweißextraktion mit Phenol bei Urin

Soll Urin ebenfalls wie Serum deproteinisiert werden, so verfährt man analog.
Ist er durch Hitzedenaturierung bereits deproteinisiert, dann kann er sogleich zur Bestimmung saurer Mucopolysaccharide weiter verwendet werden.

C.6. Nachweisreaktionen

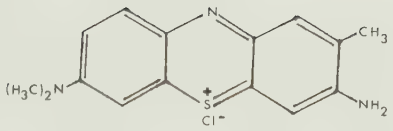
Saure Mucopolysaccharide bilden mit basischen Farbstoffen (meistens Polykationen), anderen Polykationen wie Polybrene und kationischen Detergentien schwerlösliche Addukte.

"Saure Mucopolysaccharide" sind als Salze von Polyanionen zu betrachten, so daß diese Reaktionen plausibel sind.

Zu diesen Polykationen (auch basischen Farbstoffen genannt) gehören:

1. Toluidinblau "O"
   (3 Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazthionium Chlorid)

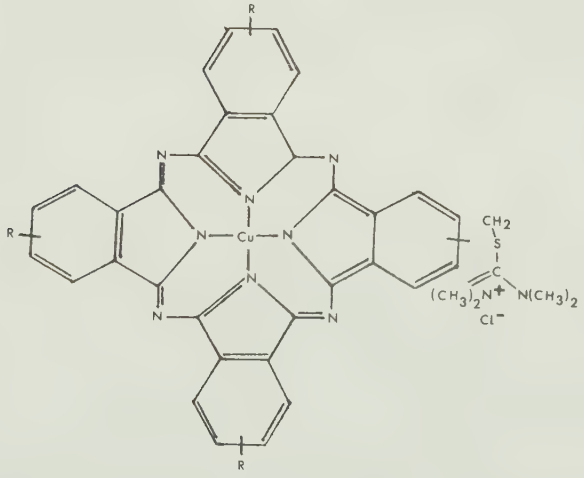
Formel



Molekulargewicht 305,83

2. Alcianblau 8GX

Formel

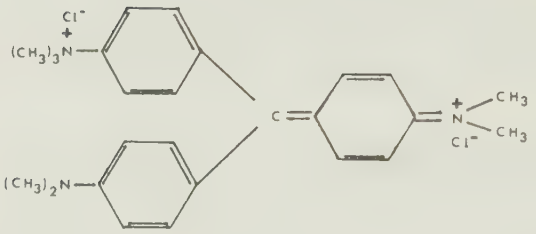


Molekulargewicht 1298,88

3. Methylgrün

((4-(bis (p-dimethylamino) phenylmethylen) 2,5 cyclohexadien-1-ylidendimethylammoniumchlorid

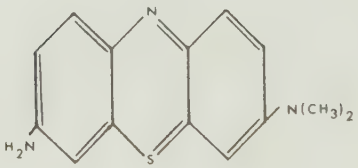
Formel



Molekulargewicht 594,76

4. Azur-A

Formel



Molekulargewicht 291,8

Sämtliche Farbstoffe sind relativ schwer im Wasser löslich. Dies bedeutet, daß - auch wenn die Farbstoffe primär in einem anderen Lösungsmittel aufgenommen wurden, wie z.B. N-Methylformamid, Eisessig, Äthylalkohol usw. - die Sättigungskonzentration im Wasser nicht überschritten werden darf.

Ein Überschreiten dieser hat zur Folge, daß das Reagenz im Wasser ausfällt, auch ohne Vorhandensein von sauren Mucopolysacchariden.
Dieser präzipitierte Farbstoff kann nach Ausfällung der sauren Mucopolysaccharide wieder in Lösung gehen und täuscht eine geringere Ausfällung vor.
Bei unmittelbarer Messung kann umgekehrt eine erhöhte Konzentration gefunden werden.

Dieser undurchsichtige Reaktionsverlauf kann nur dann vermieden werden, wenn die Sättigungskonzentration im Wasser berücksichtigt wird.
Für die Fällung muß weiterhin ein saures Milieu gewählt werden.

Der Farbstoff wird in einem Gemisch von N-Methylformamid-Eisessig gelöst.
Zunächst wird N-Methylformamid so eingewogen, daß die Farbstoffkonzentration 0,00367 g/g beträgt.
Danach wird die Farbstoff- N-Methylformamid-Lösung mit Eisessig (HAc; Molekulargewicht 60,05) auf eine Konzentration von 0,002018 g/g verdünnt.

C.7. Ansatz

0,5 ml Reagenzlösung + 2,5 ml Probe (Urin oder mit Phenol extrahiertes Serum oder Standardlösung).
Das Gemisch wird 30 Minuten bei Raumtemperatur umgewälzt, in den Zentrifugenröhrchen 20 Minuten bei 6.000 U/min. abzentrifugiert und anschließend ohne zu schütteln mit einer Eppendorfpipette vorsichtig 0,5 ml mittlere partikelfreie Lösung in eine 1 cm Einmalküvette aus Polystyrol übertragen.

Bei der Zentrifugation setzen sich farbstoffbeladene saure Mucopolysaccharide ab (Ein kleiner Teil des präzipitierten Farbstoffes oder Farbstoff-saure Mucopolysaccharide-Adduktes schwimmt oben oder haftet an der Wand an).
Zur Verdünnung wird 2,5 ml Wasser in die Einmalküvette

zugegeben.
Diese Lösung wird anschließend gemischt, nochmals zentrifugiert (10 Minuten bei 6.000 U/min.) und dann in Einmalküvette bei Meßbereich von 380 bis 420 nm gemessen.

Als Meßgerät dient ein DK2A - der Fa. Beckmann.
Durch die hohe Verdünnung (1:6) braucht ein Leerwert nicht berücksichtigt zu werden.

Im Reaktionsansatz ist das Toluidinblau-saure Mucopolysaccharide-Verhältnis = 336,4 µg Toluidinblau/g Reaktionsgemisch : 20-240 µg saure Mucopolysaccharide/g Reaktionsgemisch.
Im Falle der Anlagerung eines Toluidinblaumoleküls um einer Disaccharideinheit verbraucht 1 µg saure Mucopolysaccharide 0,588 µg Toluidinblau.

C.8. Eichkurve

Die Analyseneichfunktion stellt hier eine konkav gekrümmte Kurve dar, die bei hoher Konzentration linear ausläuft.
Theoretisch sollte sich beim Auftragen der Extinktion der Reaktionslösung gegen die Ausgangskonzentration der sauren Mucopolysaccharide eine Gerade ergeben, deren Steigung von der Anzahl angelagerter Toluidinblaumoleküle an die Basiseinheit der sauren Mucopolysaccharide abhängt.

Der unerwartete Verlauf der Analyseneichfunktion kann verschiedene Ursachen haben.
Zum einen muß daran gedacht werden, daß das Addukt eine variable, konzentrationsabhängige Zusammensetzung hat.
Zum anderen kann Toluidinblau aus Übersättigungsgründen ausfallen, sobald Kristalisationskeime vorhanden sind.
Hierfür würde sprechen, daß bei einzelnen Proben Partikel im Zentrifugatüberstand beobachtet werden können.

Ein weiterer kritischer Punkt wäre in der Reinheit der Substanz zu suchen.

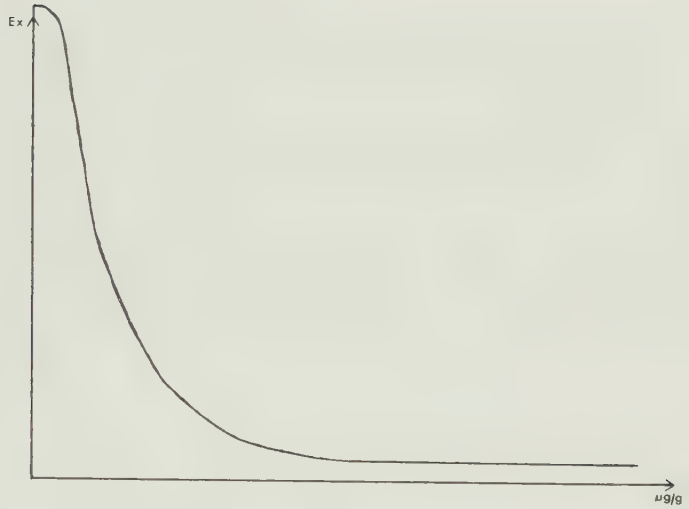


Abb. 7: Empirische Eichfunktion

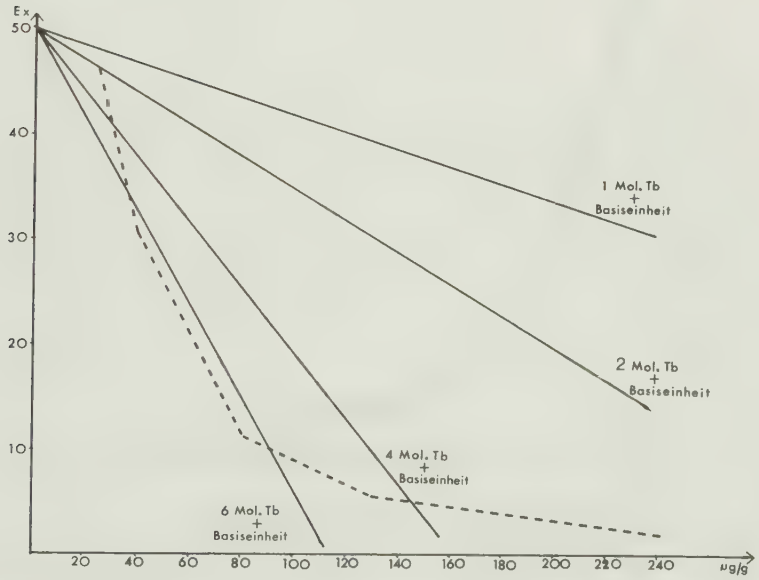


Abb. 8: Praktische Eichfunktion (--) und theoretische Eichfunktion (—).

Wie Abb. 8 zeigt, kann dieser unerwartete Verlauf durch die erwiesene Unterstellung einer zweiten Komponente des Farbstoffes erklärt werden.
Das stimmt überein mit dem Befund, der in allen Fällen beobachtet wurde, daß auch bei Überschußkonzentration der sauren Mucopolysaccharide die Eichfunktion nicht gegen Null strebt.

Schließlich können sich auch bei partieller Sättigung der sauren Mucopolysaccharide mit Farbstoffmolekülen lösliche Farbstoffaddukte ergeben, die erst bei zunehmendem Überschuß des Farbstoffes sich niederschlagen.

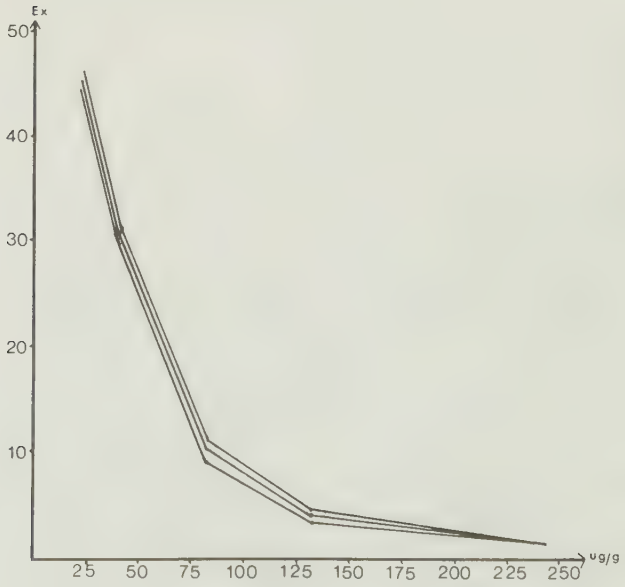


Abb. 9 : Reproduzierbarkeit der Eichfunktion.

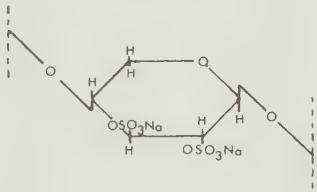
Die Auswertung erfolgt graphisch.

Da die Reaktion sehr Zeit und Temperatur empfindlich ist, wurde für jeden Versuch eine neue Eichkurve erstellt. Die Reproduzierbarkeit der Eichfunktion wird in Abb. 9 demonstriert.

C.9. Eichsubstanz

Natriumpentosanpolysulfat (SP 54)

Formel



Molekulargewicht 2970

Mangels genau definierter biologischer Referenz-Anionen beziehen wir hier die Konzentration saurer Mucopolysaccharide auf ein synthetisches Natriumpentosanpolysulfat (SP 54). Diese Substanz hat niedriges Molekulargewicht, weist einen relativ genauen Polymerisationsgrad auf und ist hinsichtlich chemischer und biologischer Eigenschaften gründlich untersucht (SP 54 Dokumentation).
Das Molekulargewicht von SP 54 ist über die Ultrazentrifugation bestimmt.

C.10. Herstellung des Standards

Die Ampullen SP 54 enthalten eine 10 % Lösung.
In 100 µl sind 10 mg = 29,744 µmol des Monomeren enthalten.
100 µl frische Ampullenlösung werden mit einer Eppendorfpipette in eine 20 ml Einmalspritze überführt.

Sodann werden ca. 20 ml Wasser aufgezogen und gemischt.
Diese Lösung enthält ca. 1,487 µmol/g Lösung.
Hälftig verdünnt ergibt sie Standard Nr. 1 (250 µg/g oder 0,7436 µmol/g Lösung).
Durch jeweiliges Verdünnen auf die Hälfte werden 5 weitere Standardlösungen hergestellt.
Wie Seite 38 festgestellt, werden die Eichlösungen in derselben Weise wie die Proben behandelt.

Für Serum braucht ein Leerwert nicht berücksichtigt zu werden.

D. E R G E B N I S S E

Tbl. 5: Einzelmesswerte der sauren Mucopolysaccharide im Serum

Nicht Otosklerosekranke			Otosklerosekranke		
x	S	Nr	x	S	Nr
84.40	5.57	11	82.41	5.39	8
82.41	5.39	14	82.09	5.36	4
79.84	5.15	17	80.47	5.21	22
69.75	4.28	33	79.84	5.15	17
69.75	4.28	35	82.41	5.39	5
69.20	4.23	31	82.41	5.39	15
67.30	4.03	15	77.03	4.90	11
69.47	4.26	36	75.52	4.77	14
64.94	3.89	20	74.33	4.67	13
64.94	3.89	25	84.05	1.32	19
63.66	3.79	23	81.01	1.25	1
62.91	3.73	37	79.82	1.23	2
62.91	3.73	24	79.82	1.23	18
61.42	3.62	28	77.21	1.17	3
63.16	3.75	20	77.21	1.17	6
61.18	3.60	21	74.97	1.12	16
61.18	3.60	22	74.97	1.12	7
59.03	3.44	30	56.43	.76	12
57.87	3.35	3	46.40	.61	9
57.87	3.35	8	33.05	.44	10
56.96	3.28	7	85.35	5.59	43
56.96	3.28	4	84.02	5.47	41
54.31	3.10	2	80.47	5.15	40
55.84	3.20	29	78.90	5.01	20
54.96	3.14	1	76.76	4.82	27
53.66	3.05	5	76.76	4.82	21
52.61	2.98	9	71.81	4.40	25
51.37	2.90	26	71.81	4.40	24

Tbl. 5 (Fortsetzung)

Nicht Otosklerosekranke			Otosklerosekranke		
x	S	Nr	x	S	Nr
44.70	2.47	6	71.81	4.40	26
41.29	2.27	16	70.13	4.26	23
39.21	2.16	34	68.50	4.13	42
36.50	2.01	13	81.03	6.81	29
36.50	2.01	19	81.03	6.81	39
35.93	1.98	10	78.87	6.56	36
30.05	1.70	12	78.87	6.56	38
29.69	1.69	18	78.87	6.56	37
24.34	1.46	27	77.37	6.38	33
84.05	1.32	43	77.37	6.38	31
82.52	1.29	44	77.37	6.38	35
81.01	1.25	41	73.88	5.99	34
73.33	1.09	39	72.75	5.86	28
73.33	1.09	40	71.91	5.77	32
72.25	1.06	42	71.91	5.77	30
68.36	.99	38	85.68	7.58	48
64.21	.90	47	84.00	7.37	45
62.11	.87	50	84.00	7.37	46
62.11	.87	45	78.53	6.70	44
49.59	.65	46	76.08	6.42	50
45.05	.59	48	74.00	6.18	47
35.58	.46	49	74.00	6.18	49

Die Konzentrationsangaben sind in µg/g aufgeführt und bezogen auf die Referenzsubstanz SP 54 sowie auf das Verfahren.

Tbl. 6: Einzelmesswerte der sauren Mucopolysaccharide im Urin

Nicht Otosklerosekranke			Otosklerosekranke		
x	S	Nr	x	S	Nr
45.45	13.70	1	17.19	6.95	10
40.75	12.32	7	65.23	17.78	99
40.31	12.20	6	60.43	15.96	94
38.17	11.62	19	58.75	15.36	97
35.55	10.94	8	57.27	14.84	98
35.36	10.89	3	53.36	13.56	96
32.93	10.31	4	53.21	13.51	112
31.70	10.02	5	52.47	13.28	109
41.20	12.44	22	51.15	12.88	111
40.75	12.32	2	50.29	12.62	110
35.55	10.94	9	49.44	12.38	91
58.36	16.87	20	49.30	12.34	92
52.47	14.86	21	47.12	11.74	95
50.90	14.36	11	47.12	11.74	89
45.99	12.87	12	44.78	11.13	93
39.30	11.06	13	38.23	9.67	65
36.98	10.49	17	35.02	9.07	90
36.06	10.27	14	36.29	11.23	29
30.35	9.01	15	52.69	18.02	73
29.44	8.82	18	51.97	17.77	74
29.44	8.82	16	48.46	16.60	79
53.81	16.64	23	45.62	15.69	76
50.44	15.46	31	43.35	14.99	78
43.36	13.19	30	41.19	14.34	77
41.31	12.59	33	32.19	11.83	75
40.43	12.34	32	29.47	11.11	87
40.21	12.28	28	23.91	9.69	88
36.29	11.23	27	51.96	11.63	83
33.47	10.53	34	51.15	11.42	81
32.23	10.24	24	48.59	10.75	53
43.84	13.33	25	44.56	9.75	82

Tbl. 6 (Fortsetzung)

Nicht Otosklerosekranke			Otosklerosekranke		
x	S	Nr	x	S	Nr
35.32	10.99	26	44.03	9.63	85
28.61	4.64	43	42.00	9.15	52
30.86	4.94	44	37.17	8.08	80
32.50	5.17	51	35.74	7.78	84
33.82	5.36	40	44.03	9.63	86
35.19	5.56	41	39.95	7.61	101
36.19	5.71	48	44.77	8.59	104
40.13	6.32	36	47.68	9.22	106
40.13	6.32	38	49.01	9.51	100
42.26	6.67	37	50.77	9.91	103
44.32	7.03	46	51.78	10.15	105
47.24	7.54	39	58.48	11.78	107
47.24	7.54	54	60.82	12.38	102
49.94	8.04	45	44.77	8.59	108
49.94	8.04	47	56.93	12.58	114
54.08	8.84	42	51.36	11.10	116
57.86	9.61	50	50.15	10.79	117
37.80	5.95	49	44.53	9.43	113
41.30	8.70	112	42.80	9.03	115

Die Konzentrationsangaben sind in µg/g aufgeführt und bezogen auf die Referenzsubstanz SP 54 sowie auf das Verfahren.

Tbl. 7: Fraktion der sauren Mucopolysaccharide im Serum nicht otosklerosekranker und otosklerosekranker Patienten nach der Extraktion mit Phenol (Serum : Wasser : Phenol = 1 : 1,064 : 1,121) Reagenz: Toluidinblau ; Standard: SP 54 Dimension: µg SP 54/g Serum

Stichprobe 1	Nicht Otosklerosekranke
Anzahl =	50.00
Mittelwert =	58.83
Standardabweichung =	15.01
Min-Wert =	24.34
Max-Wert =	84.40
U-Wert =	2115.00

Stichprobe 2	Otosklerosekranke
Anzahl =	50.00
Mittelwert =	75.73
Standardabweichung =	9.19
Min-Wert =	33.05
Max-Wert =	85.68
U-Wert =	385.00
Signifikanz =	5.96

Die Tbl. 7 zeigt bei otosklerosekranken Patienten einen stark erhöhten Mittelwert und eine geringere Standardabweichung dieser Fraktion als bei nicht otosklerosekranken Patienten.

Tbl. 8: Fraktion der sauren Mucopolysaccharide im Urin nicht otosklerosekranker und otosklerosekranker Patienten nach der thermischen Fällung
Reagenz: Toluidinblau ; Standard: SP 54
Dimension: µg SP 54/g Urin

Stichprobe 1	Nicht Otosklerosekranke
Anzahl =	50.00
Mittelwert =	40.33
Standardabweichung =	7.74
Min-Wert =	28.61
Max-Wert =	58.36
U-Wert =	1793.00

Stichprobe 2	Otosklerosekranke
Anzahl =	50.00
Mittelwert =	46.33
Standardabweichung =	9.21
Min-Wert =	17.19
Max-Wert =	65.23
U-Wert =	707.00
Signifikanz =	3.74

Die Tbl. 8 zeigt bei otosklerosekranken Patienten nur eine geringe Erhöhung des Mittelwertes dieser Fraktion wie bei nicht otosklerosekranken Patienten.

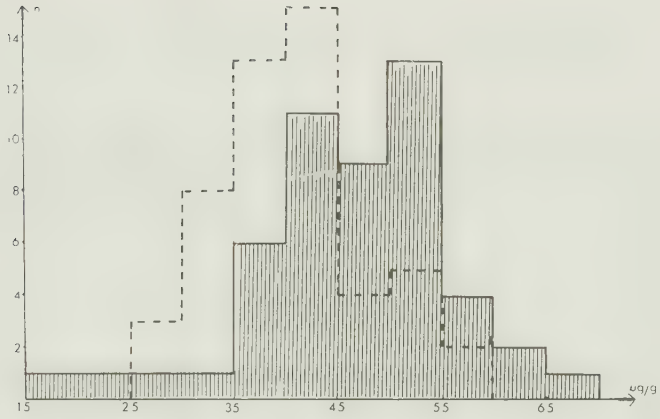


Abb. 10: Absolute Häufigkeitskurve von Konzentrationen saurer Mucopolysaccharide im Urin nicht otosklerosekranker (--) und otosklerosekranker (—) Patienten.

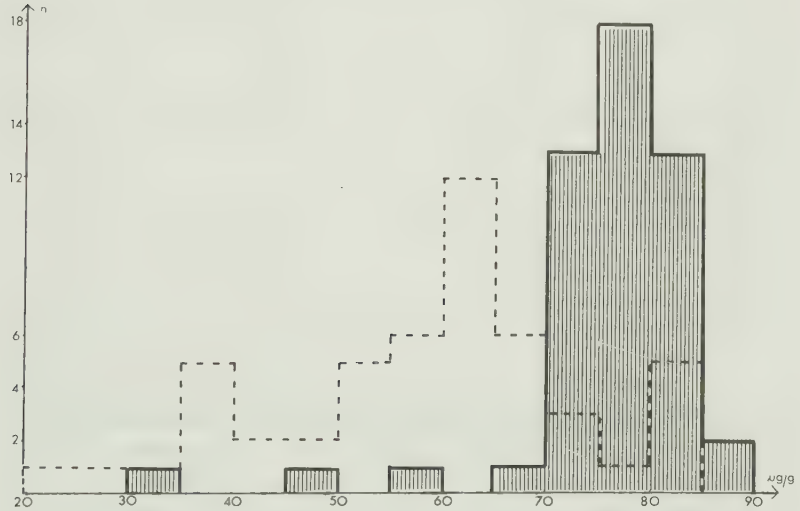


Abb. 11: Absolute Häufigkeitskurve von Konzentrationen saurer Mucopolysaccharide im Serum nicht otosklerosekranker (--) und otosklerosekranker (—) Patienten.

D.1. Beispiel zur Auswertung der Ergebnisse nach U-Test von Mann - Whitney - Wilcoxon

Mucopolysaccharidegehalt im Serum		Rangzahlen	
Otosklerose	Nicht-Otosklerose	Otosklerose	Nicht-Otosklerose
85,68	84,40	40	38
84,00	82,41	35,5	34
84,00	79,84	35,5	30
78,53	69,75	28	17,5
76,08	69,75	25	17,5
74,00	69,20	23,5	15
74,00	67,30	23,5	13
85,35	69,47	39	16
84,02	64,94	37	11,5
80,47	64,94	31	11,5
78,90	63,66	29	10
76,76	62,91	26,5	7,5
76,76	62,91	26,5	7,5
71,81	61,42	21	6
71,81	63,16	21	9
71,81	61,18	21	4,5
70,13	61,18	19	4,5
68,50	59,03	14	3
81,03	57,87	32,5	1,5
81,03	57,87	32,5	1,5
$n_1 = 20$	$n_2 = 20$	$R_1 = 561$	$R_2 = 259$

Tbl. 9: Mucopolysaccharidegehalt im Serum und zugehörige Rangzahlen bei Otosklerose und Nicht-Otosklerose.

Hypothesen: H_0 : $F_1(x) = F_2(y)$ -----→ Nullhyppothese

H_1 : $F_1(x) \neq F_2(y)$ -----→ Alternativ-hypothese

Prüfgröße: $U = R_1 - \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2}$ $\qquad U' = R_2 - \frac{n_2 (n_2 + 1)}{2}$

$= 561 - \frac{20 (21)}{2}$ $\qquad = 259 - 210$

$= 561 - 210$ $\qquad = 49$

$= 351$

Quantil (Kritischer U-Wert): $U_\alpha; n_1, n_2 = U_{0,02; 20, 20}$

$= 114$

------→ bei Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,02 \triangleq 2\ \%$

Im Gegensatz zu den Kriterien bei den parametrischen Verfahren muß der kritische U-Wert von der berechneten Prüfgröße unterschritten werden, wenn H_0 zurückgewiesen werden soll.
Das hängt damit zusammen, daß zum Vergleich der kleinere der berechneten Werte U; U' herangezogen wird.
Prüfgröße ist somit der kleinere der beiden U-Werte.
In diesem Fall gilt: 49 < 114.
Damit kann die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $\alpha = 0,02 \triangleq 2\ \%$ verworfen werden.

Der U-Test dient zur Prüfung der Hypothese H_0, daß die Verteilungsfunktionen F_1 und F_2 zweier Grundgesamtheiten übereinstimmen, d. h. $H_0 : F_1 = F_2$, an Hand zweier unabhängiger Stichproben (x_1, ... x_n) und (y_1, ... y_n) von dem Umfang n_1 bzw. n_2 aus den nach F_1 bzw. F_2 verteilten Grundgesamtheiten.

Beim zweiseitigen Test wird die Hypothese $H_0 : F_1 = F_2$ gegen die Alternativhypothese $H_1 : F_1 \neq F_2$ geprüft, wobei H_0 abgelehnt wird, falls $\min(U; U') < U_\alpha; n_1, n_2$ ist.

Für die gesamten Stichproben im Serum nicht otosklerosekranker und otosklerosekranker Patienten (siehe Tbl. 7) gilt:
Prüfgröße = 385 (bei U = 2115; U' = 385).
Mit $\alpha = 0,02$ und für $n_1 = 50$; $n_2 = 50$ ist der kritische U- Wert 913.
Der kritische U-Wert überschreitet die Prüfgröße, so daß die Nullhypothese verworfen werden kann.

Für saure Mucopolysaccharide im Urin nicht otosklerosekranker und otosklerosekranker Patienten (siehe Tbl. 8) findet sich die Prüfgröße = 707.
Auch hier ist die Nullhypothese zu verwerfen.

Bei otosklerosekranken Patienten ist eine Fraktion der sauren Mucopolysaccharide im Serum wie auch im Urin höher als in einem Vergleichskollektiv.
Dieser Befund bezieht sich auf die vorgegebene Methode, insbesondere das Extraktionsverfahren.

E. D I S K U S S I O N

Zechner ließ bei 3 Patienten mit florider Otosklerose die Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Urin überprüfen.
Die Ausscheidung saurer Mucopolysaccharide im Urin wurde nur bei diesen, kontrolliert durch Operation und als rote weiche Herde identifiziert, vermehrt gefunden.
Die Konzentration der sauren Mucopolysaccharide war stets negativ bei Ringbandsklerosen und alten inaktiven Otosklerose-herden.

Soifer fand dagegen bei einem Stichprobenumfang von 34 Otosklerosekranken und von 36 männlichen Patienten ohne Otosklerose weder einen Unterschied in der Urinausscheidung der Gesamtmucopolysaccharide noch einen in den einzelnen Fraktionen.

Man muß die von Soifer und Mitarbeiter festgestellte Identität in der Konzentration der sauren Mucopolysaccharide unter dem Aspekt der differierenden Methodik betrachten, hinzu kommt möglicherweise noch der Zusammenhang dieser negativen Befunde mit den alten inaktiven Herden oder Ringbandsklerosen.

Aufgrund fokaler Läsion ist nicht zu erwarten, daß sich erhebliche Änderungen der sauren Mucopolysaccharide im Serum und Urin ergeben.
Eine Tendenz kann nur durch Messungen an einer umfangsreichen Population erkannt werden und diese ist auch in den Werten von Soifer zu ersehen; wie Tbl. 1 zeigt, könnten die Werte der sauren Mucopolysaccharide im Urin bei otosklerosekranken Patienten als leicht erhöht betrachtet werden.

Für die hier durchgeführte Untersuchung saurer Mucopolysaccharide im Urin bei einem Stichprobenumfang von jeweils 50 otosklerosekranken und nicht otosklerosekranken Patienten wurde ebenfalls eine geringe Erhöhung saurer Mucopolysaccharide im Urin bei otosklerosekranken Patienten gefunden (siehe Tbl. 8).

Die Konzentration der sauren Mucopolysaccharide im Serum ist bei gleichem Stichprobenumfang bei otosklerosekranken Patient-

en wesentlich mehr erhöht (siehe Tbl. 7).

Die Untersuchung saurer Mucopolysaccharide im Urin ist wenig aussagekräftig, wenn man bedenkt, daß die Veränderungen der Blutchemie sich nicht immer in der Urinausscheidung wiederspiegeln.
Zudem ist anzunehmen, daß diese makromolekularen Komponenten (Molekulargewicht zwischen 25.000-50.000) nicht in jedem Fall nierengängig sind (nierengängig bis Molekulargewicht von ca. 10.000); daher müssen Untersuchungen saurer Mucopolysaccharide im Serum und Urin parallel durchgeführt werden.

Bei der Untersuchung des Serums wurden die mit Phenol nicht extrahierbaren Komponenten bestimmt.
Nach H.E. Schultze, Michon und Kickhöfen können Proteine mit Phenol weitgehend aus wäßriger Phase extrahiert werden, wobei besonders saure Glykoproteide und saure Mucopolysaccharide in wäßriger Phase bleiben.

Für die Nachweisreaktion wählt man zusätzlich ein saures Milieu; damit mitüberführte, neutrale Proteine keine Addukte bilden.
Bei der Messung der Urinprobe muß man auf die Urineigenfärbung hinweisen, die aber bei den hohen Extinktionskoeffizienten von Toluidinblau keine Rolle spielt.

Das angewendete Verfahren ist relativ, d.h. die Messung saurer Mucopolysaccharide wird auf SP 54 oder Chondroitinsulfat oder Heparin usw. bezogen.
Mit diesem Verfahren sind die gleichen Ergebnisse nur dann zu erwarten, wenn alle andere Faktoren (z.B. Farbstoff, pH, Zeit, Reagenzien, Standard) identisch sind.

Mit der hier durchgeführten Bestimmung werden alle saure Mucopolysaccharide und ein Teil neutraler bzw. saurer Glykoproteide erfaßt.
Wir verzichten zunächst auf die differenzierte Bestimmung und begnügen uns mit dieser Methode.

Durch Variationen des Serum-Wasser-Phenol-Verhältnisses sowie durch Verwendung anderer Reagenzien (Cetyltrimethylammoniumbromid, Polybrene, Alcianblau usw.) können differenzierte Informationen gewonnen werden.

Schließlich verspricht auch die Gelelektrophorese oder HPLC (High Perforance Liquid Chromatographie) eine weitere Aufschlüsselung.

F. Z U S A M M E N F A S S U N G

Bei den Untersuchungen zweier Population saurer Mucopolysaccharide im Serum und Urin von Otosklerose finden sich Unterschiede.

Tbl. 10: Fraktion der sauren Mucopolysaccharide im Serum nicht otosklerosekranker und otosklerosekranker Patienten nach der Extraktion mit Phenol (Serum: Wasser: Phenol = 1 : 1,064 : 1,121) Reagenz: Toluidinblau; Standard: SP 54 Dimension: µg SP 54/g Serum

Stichprobe 1		
Anzahl =	50.00	
Mittelwert =	58.83	
Standardabweichung =	15.01	Nicht-Otosklerose
Min-Wert =	24.34	
Max-Wert =	84.40	
U-Wert =	2115.00	
Stichprobe 2		
Anzahl =	50.00	
Mittelwert =	75.73	
Standardabweichung =	9.19	Otosklerose
Min-Wert =	33.05	
Max-Wert =	85.68	
U-Wert =	385.00	
Signifikanz =	5.96	

Tbl. 11: Fraktion der sauren Mucopolysaccharide im Urin nicht otosklerosekranker und otosklerosekranker Patienten nach der thermischen Fällung
Reagenz: Toluidinblau; Standard: SP 54
Dimension: µg SP 54/g Urin

Stichprobe 1		
Anzahl =	50.00	
Mittelwert =	40.33	
Standardabweichung =	7.74	Nicht-Otosklerose
Min-Wert =	28.61	
Max-Wert =	58.36	
U-Wert =	1793.00	
Stichprobe 2		
Anzahl =	50.00	
Mittelwert =	46.33	
Standardabweichung =	9.21	Otosklerose
Min-Wert =	17.19	
Max-Wert =	65.23	
U-Wert =	707.00	
Signifikanz =	3.74	

1. Die vorliegenden Seren und Urin stammen von Patienten, deren Otosklerose durch eine kurz zuvor unternommene Stapedektomie abgesichert ist.

2. Werden diese Ergebnisse mit denen von Soifer verglichen, dann fällt die Abhängigkeit dieser von der angewandten Methode besonders auf.

3. Die Variabilität der Ergebnisse beweist, daß die Bestimmungen der sauren Mucopolysaccharide nicht problemlos sind. Nur ein gleiches, standardisiertes Verfahren führt zu vergleichbaren Ergebnissen.

4. Es ist festzustellen, daß bei Wahl eines anderen Mischungsverhältnisses von Phenol und Probe bei der Proteinextraktion sowie bei der Wahl anderer Reagenzien, andere Fraktionen dieser Substanzklasse erfasst werden.
Die Ergebnisse können sich dann dahingehend ändern, daß otosklerosekranke Patienten scheinbar weniger "saure Mucopolysaccharide" im Serum aufweisen.
Tatsächlich aber ist nur die mittlere Konzentration einer anderen Fraktion erniedrigt.

Von Bedeutung ist, daß bei Anwendung geeigneter Methoden sich im Serum und im Urin otosklerosekranker Patienten zwar kleine aber signifikante Konzentrationsunterschiede zu Vergleichskollektiven nachweisen lassen.

Das Ziel weiterer Untersuchungen sollte die differenzierte Bestimmung der Komponenten sein.

G. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ADAIR-DIGHTON, C.A. — Four generations of blue sclerotics. Ophthalmoscope 10: 188, 1912

2. ANTOLI-CANDELA, F. — Histopathological Observations on the Cochlear Changes in Otosclerosis Ann. Otol. 86: 813-820, 1977

3. ARNOLD, W. — Veränderungen im Bereich der Mittelohrschleimhaut bei der Otosklerose. Acta Otolaryngol. (Stockh) 81 (3-4): 185-196, 1976

4. ARNOLD, W
PLESTER, D. — Gefäßveränderungen bei der Otosklerose und ihre Auswirkungen auf die mesenchymale Reaktion des Mucoperiostes. Arch. Otorhinolaryngol. 209 (2): 127-143, 1975

5. ARNOLD, W
PLESTER, D. — Histologische und klinische Aspekte bei florider Otospongiose der Steigbügelfußplatte mit Beziehung zur Perilymphe. Arch. Otorhinolaryngol. 215 (2): 159-178, 1977

6. ASKENASI, R. — Urinary Hydroxylysine and Hydroxylysyl Glycoside Excretions in normal and Pathologic States. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine 83 (4): 673-679, 1974

7. BARRY, H.C. — Orthopedic Aspects of Paget's Disease of Bone. Arthritis and Rheumatism 23: 1128-

1130, 1980

8. BEICKERT, P. Otosklerose.
Ohr (Prof. Zöllner). Georg Thieme Verlag Stuttgart 705-, 1965

9. BERGGREN, L. Acta Ophthalmol. 47: 122-128, 1969

10. BERNSTEIN, J. Middle Ear Mucosa in Health and Disease.
Arch. Otolaryngol. 94 (1): 30-35, 1971

11. BREITMANN. Siehe PUHAKKA, H.J.

12. BRETLAU, P. Otosclerosis and Osteogenesis Imperfecta.
Arch. Otolaryng. 90: 30-36, 1969

13. BRONSON, E. Fragillitas ossium and its association with blue sclerotics and otosclerosis.
Edinb. Med. J. 18: 240-, 1917

14. BRÜHL, G. Bemerkungen zur O. Mayers Arbeiten über die Entstehung der Spontanfrakturen der Labyrinthkapsel und ihre Bedeutung für die Otosklerose.
Z. Hals-, Nas.- u. Ohrenheilk. 26: 587-, 1938.

15. BURLINGAME, R et al. Direct Quantitation of Glycosaminoglycans in 2 ml of Urine from Patients with Mucopolysaccharidoses.
Clinical Chemistry 27 (1): 124-128, 1981

16. CAREY, M.C. Osteogenesis imperfecta in 23 members of a kindred with heritable features contributed by a non-specific skeletal disorder.
Q. J. Med. 37: 437-449, 1968

17. CAWTHORNE, T. Otosclerosis.
J. Laryngol. Otol. 69: 437-457, 1955

18. CAWTHORNE, T. Review of surgery of otosclerosis. Proc. roy. Soc. Med. 40: 320-, 1947

19. CHEVANCE, L.G. Biochemical study on otosclerosis: An explanation of inner ear deaffnes. Acta Otolaryngol. (Stockh.) 81: 200-, 1975

20. CLAUSS, G EBNER, H. Grundlagen der Statistik. Für Psychologen, Pädagogen und Soziologen. Verlag Harri Deutsch, Thun und Frankfurt 1977

21. COLLINS, D.H. Paget's disease of bone. Incidence and subclinical forms. Lancet 51: 1956/2

22. DIFERRANTE, N RICH, C. The Determination of acid Aminopolysaccharide in Urine. J. Lab. & Clin. Med. 48: 491-494, 1956

23. DISCHE, Z. A New Specific Color Reaktion of Hexuronic Acids. J. Biol. Chem. 167: 189-198, 1947

24. DORFMANN, A. Vererbbare Krankheiten des Bindegewebes. Med. Prisma 3: 71-, 1971

25. DORLING, J. Localisation of sulphated glycosaminoglycans in the mucopolysaccharidoses by a simple technique using cryostat sections. Journal of Clinical Pathology 33: 897-898, 1980

26. DU FOUR, J.J. BERTRAND, R. Osteogenesis imparfaite et syndrome de van der Hoeve. Can. J. Otolaryngol. 1: 189-193, 1972

27. ELSON u. MORGAN. Siehe YAMAMOTO, A.

28. ETO, J et al. Urinary Acid Mucopolysaccharides in Multiple Sulfatase Deficiency (Mucosulfatidosis).
European Journal of Pediatrics 132: 207-211, 1979

29. EUCHEN, U. Grundriß der Physiologischen Chemie.
Akad. Verlagsges. Leipzig 271-272, 1956

30. FEDOTOV, A.F. Morphohistochemical Characteristics of the Otosclerotic Process.
Arch. Otolaryngol. 90 (3): 400-403, 1969

31. FISCHER u. BOEDECKER. Siehe RAPOPORT, S.M S. 695

32. FOWLER, E.P. Calcium and phosphorus, and phosphatase activity in otosclerosis.
Arch. Otolaryng. 47: 491-, 1948

33. FOWLER, E.P. The incidence and degrees of blue scleras in otosclerosis and other disorder.
Laryngoscope (St. Louis) 59: 406-, 1949

34. FREEMAN, J. Progressive Sensorineural Hearing Loss and Cochlear Otosclerosis: A Prospective Study.
The Laryngoscope 89: 1487-1521, 1979

35. GANZ, H. Hals-Nasen-Ohrenheilkunde.
Medizin von Heute 6: 175-180, 1978

36. GHORAYEB, B. Otosclerotic Inner Ear Syndrome.
Ann. Otol. 87: 85-90, 1978

37. GITZELMANN, R et al. Unusually mild course of β-glucuronidase deficiency in two brothers (Mucopolysaccharidosis 7).
Helv. paediat. Acta 33: 413-428, 1978

38. GRAY, A.A. The Otosclerosis Problem.
J. Laryng. 49: 629-, 1934

39. GREIFENSTEIN, A. Vergleichende Untersuchungen zur Histologie der Otosklerose.
Arch. Ohr.-, Nas.- u. Kehlk.-Heilk. 139: 14-, 1935

40. HILBORN, J.C et al. Acrylamide Gel Electrophoresis of Acidic Mucopolysaccharides.
Analytical Biochemistry 31: 51-58, 1969

41. HURST, R.E et al. Glycosaminoglycan Excretion in Osteogenesis Imperfecta.
Clinica Chimica Acta 100: 307-311, 1980

42. JAKOBS, F. Otosclerosis.
Britisch Med. J. 25 March 1978, S. 790

43. JAKOBS, F. Otosclerosis.
British Med. J. 14 January 1978, S. 63-64

44. KAISER, G et al. Zur Bedeutung der Ausscheidung von Aminosäuren und sauren Mucopolysacchariden im Harn bei orthopädischen Erkrankungen.
Beitr. Orthop. Traumatol. 16 (10): 545-552, 1969

45. KAKIZAKI, I ZECHNER, G. The Osteocytes of the Human Labyrinthine Capsule.
Arch. Otolaryngol. 94 (2): 139-150, 1971

46. KARLSON, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie. S. 290-293
Georg Thieme Verlag Stuttgart 1974

47. KELEMEN, G ALONSO, A. Penetration of the Cochlear Endost by the fibrous component of the Otosclerotic Focus.
Acta Otolaryngol. 89: 453-458, 1980

48. KELLEHER, Ph.C. Urinary Excretion of Hydroxyproline, Hydroxylysine and Hydroxylysine Glycosides by Patients with Paget's Disease of Bone and Carcinoma with Metastases in Bone. Clin. Chim. Acta 92: 373-379, 1979

49. KEY, T.C et al. Osteogenesis Imperfecta as a Complication of Pregnancy. Obstetrics and Gynecology 51 (1): 67-71, 1978

50. KICKHÖFEN, B BÜRGER, M. Das Verhalten von Proteinen in Phenol (Ribonuclease). Biochim. Biophys. Acta 65: 190-199, 1962

51. KINNETT, J.G. Urinary Amino Acids in Osteogenesis Imperfecta. Metab. Bone Dis. & Rel. Res. 1: 299-302, 1979

52. KIRIKAE, I. Persönliche Mitteilung 1962.

53. KOSEKI, M et al. Sialogluciduria in Lysosomal Disease: Quantitative and Qualitative Analysis of Urinary Low Molecular Sialoglucides from Patients with Mucopolysaccharidosis and with Mucolipidosis. Tohoku J. Exp. Med. 124: 351-360, 1978

54. KRANE, S.M KANTROWITZ, F. Urinary Excretion of Hydroxylysine and its Glycosides as an Index of Collagen Degradation. The J. of Clin. Invest. 59: 819-827, 1977

55. KRANE, S.M MUNOZ, A.J. Collagen-Like Fragments: Excretion in Urine of Patients with Paget's Disease of Bone. Science 157: 713-716, 1967

56. KRUKENBERG. Siehe RAPOPORT, S.M. S. 695

57. KUTTNER, K et al. Ultrahistochemical studies to demonstrate Mucopolysaccharides in the organ of Corti of the Guinea Pig.
Inner Ear Biology 68: 201-208, 1977

58. KYSELKA, R et al. Quantitative und qualitative Veränderungen saurer Mucopolysaccharide im Urin bei Erkrankungen des Skelettsystems.
Beitr. Orthop. Traumatol. 16 (10): 552-558 1969

59. LAMON, J.M TROJAK, J.E. Bone Cysts in Mucopolysaccharidosis I-S (Scheie Syndrome).
The Johns Hopkins Med. J. 146: 73-75, 1980

60. LARSSON, A. Otosclerosis: a genetic and clinical Study.
Acta Otolaryng. (Stockh.) Suppl. 154: 5-, 1960

61. LARSSON, A. Genetic problem in Otosclerotic.
Internat. Symp. "Otosclerosis", Detroid 1960. Little Brown, Boston 1963

62. LOEBELL u. NAUCK. Die funktionelle Anatomie des menschlichen Felsenbeines.
Z. Hals-, Nas.-u. Ohrenheilk. 34: 129-, '33

63. LUDERSCHMIDT, Ch et al. Mucopolysaccharidose I-S (Morbus Scheie).
Dtsch. med. Wschr. 104: 1482-1487, 1979

64. MANASSE, P. Über Ossifikationsanomalien im menschlichen Felsenbein.
Arch. Ohrenheilk. 95: 145-, 1914

65. MAYER, O. Untersuchungen über die Otosklerose.
Wien-Leipzig: Holder 1917

66. MC KUSICK, V.A. Heritable disorders of connective tissue. St. Louis: C.V. Mosby Comp. 1960

67. MC KUSICK, V.A. Heritable Disorders of Connective Tissue. St. Louis, Mosby: 718-723, 1972

68. METCALFE, D.D et al. Identification of Sulfated Mucopolysaccharides Including Heparin in the Lesional Skin of a Patient with Mastocytosis. The J. of Investigative Dermatology 74: 210-215, 1980

69. MEYER, K. Excretion of sulfated mucopolysaccharides in gargoylism (Hurler's syndrome). Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 97: 275-, 1958

70. MEYER, M. Pathologie der Erkrankungen des Skelettsystems und Innenohrkapsel. Virchows Arch. path. Anat. 288: 112, '33

71. MICHON, J. Preparation of Orosomucoid (α_1-Acid Seromucoid). Nature S. 1077-1078, 1962

72. MONKHOUSE u. JAQUES. Phenol Method of Plasma. Methods of Biochemical Analysis 7 (D. Glick, Ed.); Acad. Pres. New York S. 274, 1959

73. MOOREFIELD, W.G et al. Aftermath of Osteogenesis Imperfecta: The Disease in Adulthood. The J. of Bone and Joint Surgery 62-A (1): 113-119, 1980

74. MORGAN, W.T.J. Biochem. J. 35: 1140-, 1941

75. MÜLLER, P.H. Tafeln der mathematischen Statistik.

VEB Fachbuchverlag Leipzig S. 234

76. NYLEN, B. Histopathological investigations on the localisations, number, activity and extent of otosclerotic foci. J. Laryng. 63: 321-, 1949

77. NYLEN u. NYLEN. Siehe PUHAKKA, H.J.

78. O'BRIEN. Bestimmung von Glycosaminoglycanen. Analytical Biochemistry 85: 377-386

79. OGILVIE, R.F HALL, J.S. On the Aetiology of Otosclerosis. The J. of Laryng. and Otol. : 841-846 886-896, 1962

80. PALVA, T et al. Histochemistry of Normal Middle Ear Mucosa. Arch. of Otolaryng. 102 (5): 271-275, 1976

81. PEARSE, E. Histochemistry. J. A. Churchill LTD; London 1960

82. PLESTER, D. Orale Kontrazeptiva bei Otosklerose ?. Deutsche Med. Wochenschift-Fragen aus der Praxis 104: 1368, 1979

83. PLOTZ, E u. PERLMAN. A histochemical study of the cochlea. Laryngoscope 65: 291-, 1955

84. POLITZER, A. Über die primäre Erkrankung der knöchernen Labyrinthkapsel. Z. für Hals-, Nas.- u. Ohrenheilk. 25: 309-327, 1894

85. PUHAKKA, H.J. Studies on the inorganic component of otosclerotic bone. Acta Oto-Laryngologica. Suppl. 280: 1-, 1971

86. QUISLING, R.W et al. Osteogenesis imperfecta - Study of 160 Family Members. Arch. of Otolaryngol. 105: 207-211, 1979

87. RAPOPORT, S.M. Bindegewebe, Stützgewebe, Haut und Anhänge. Medizinische Biochemie S. 694- ; VEB Verlag Berlin 1977

88. RINGE, J.D et al. Osteodystrophia deformans Paget; Vorkommen Beschwerdebild und Komplikationen. Dtsch. med. Wschr. 104: 1837-1842, 1979

89. RISKAER. Biochemical Conditions in patients with otosclerosis. Arch. Otolaryng. (Chicago) 49: 414-, 1949

90. RÖMPPS. Chemie-Lexikon.

91. RUFINI, S et al. A new Screening Test for the Diagnosis of Mucopolysaccharidoses. Clin. Chim. Acta 95: 443-446, 1979

92. RYAN, W.G. Paget's Disease of Bone. Ann. Rev. Med. 28: 143-152, 1977

93. SCHOENHEYDER, F et al. Urinary Excretion of Amino Acids and Hexosamine in otosclerotic Patients. Arch. Otolaryngol. 84 (5): 495-496, 1966

94. SCHUKNECHT, H.F. Cochlear Otosclerosis. Arch. Otorhinolaryngol. 222: 79-84, 1979

95. SCHULTZE, H.E. Molecular Biology of Human Proteins, Vol 1 Elsevier Amsterdam 1966; S. 189 u. 290

96. SEIFERT. Siehe PUHAKKA, H.J.

97. SHAMBOUGH, G.E. Surgery of the ear. Saunders, Philadelphia u. London 1959

98. SIEBENMANN, F. Über die Anfangsstadien und über die Natur der progressiven Spongiosierung der Labyrinthkapsel.
Verh. dtsch. otol. Ges. 21: 186-, 1912

99. SIEBENMANN, F. Demonstration mikroskopischer und makroskopischer Präparate von Otospongiosa progressiva.
Trans. Intern. Otol. Congr. 9: 538-, 1912

100. SINGER, F. Paget's Disease of Bone.
New York, Plenum 1977

101. SIRIS, E.S et al. Paget's Disease of Bone.
Bull. N.Y. Acad. Med. 56 (3): 285-304, 1980

102. SOIFER, N et al. Biochemical studies of Otosclerosis. An Investigation of the ground substance in bone and vein.
Arch. Klin. Exp. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd. 193 (1): 1-9, 1969

103. SOIFER, N et al. Biochemical studies of Otosclerosis: Urinary Acid Mucopolysaccharides.
Arch. Klin. Exp. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd. 197 (1): 1-6, 1970

104. TARASENKOVA, N.S. Otosclerosis and physiologic hyperestrogenicity (Russian).
Vestn. Otorinolaring. 29: 52-, 1967

105. THANE, D.R et al. Otosclerosis: Vestibular Symptoms and Sensorineural Hearing Loss.
Ann. Otol. 87: 778-796, 1978

106. TOYNBEE, J. Pathological and surgical observations on the diseases of the ear.
Med.-chir. Trans. 24: 190-, 1924

107. TROJAK, J.E. et al., Morquio-like Syndrome (MPS IV-B) Associated With Deficiency of a β-Galactosidase. The Johns Hopkins Med. J. 146: 75-79, 1980

108. TURAKAINEN, H et al. Synthesis of hyaluronic acid and collagen in skin fibroblast cultured from patients with Osteogenesis imperfecta. Biochim. et Biophys. Acta 628: 388-397, '80

109. UEHLINGER, E. Ostitis deformans Paget. Schinz, H.R. et al.: Lehrbuch der Röntgendiagnostik, II (1), 6. Aufl. (Thieme Stuttgart 1979)

110. VALSALVA, A.M. Opera: hoc est de aura humana tractatus. Ludg. Bat. Cap. II. X 22. 1742

111. VAN DER HOEVE u. DE KLEYN. Blaue Sclera, Knochenbruchigkeit und Schwerhorigkeit. Albrecht van Graefes Arch. Klin. Ophthalmol 95: 81-93, 1918

112. VARMA, R.S et al. Serum Acid Mucopolysaccharide (Glycosaminoglycans) levels in Psychiatric Patients. Neuroscience Letters 14: 349-354, 1979

113. VYSLONZYL, E KLEIN, K. Über das Verhalten der Östrogene bei männlichen Otosklerosepatienten. Wien Klin. Wschr. 73: 485-, 1961

114. WARDI. Zur Färbung von Glycoprotein in der Elektrophorese. Analytical Biochem. 18: 621-623

115. WEBER, M. The blue mantles in otosclerosis. Ann. Otol. (St.Louis) 42: 438-, 1933

116. WESTPHAL, O. Z. Naturforsch. 7b: 148-, 1952

117. WULLSTEIN, H.L
KLEY, W.
Zur Biochemie der Perilymphe operierter Otosklerosen.
Z. Laryngol. Rhinol. Otol. 39 (10): 665-, 1960

118. YAMAMOTO, A et al.
Localized β-Galactosidase Deficiency.
Arch. Intern. Med. 134: 627-634, 1974

119. ZECHNER, G
ALTMANN, F.
The temporal bone in Hunter's Syndrome (Gargoylism).
Arch. Klin. Exp. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd. 192 (2): 137-144, 1968

120. ZECHNER, G
ALTMANN, F.
Über blaue Mäntel in der menschlichen knöchernen Labyrinthkapsel.
Arch. Klin. Exp. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd. 201 (2): 172-180, 1972

121. ZECHNER, G
MANOLIDIS, L.
Mucopolysaccharidose und Otosklerose.
Arch. Klin. Exp. Ohren Nasen Kehlkopfheilkd. 202 (2): 634-638, 1972

122. DAVENPORT, MILLES, FRINK.
The genetic factor in otosclerosis.
A.M.A. Arch. Otolaryng. 17: 135, 340, 503, 1933

123. DENKER, A.
Die Otosklerose. Wiesbaden 1904

124. GRISTWOOD, R.E.
J. Laryngol. Otol. 80: 1115, 1966

125. GUILD, S.R.
Histologic otosclerosis.
Ann. Otol. (St. Louis). 53: 246-, 1944

126. HABERMANN.
In: Beickert, P: Otosklerose.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 705, 1965

127. HALL et al.
In: Beickert, P: Otosklerose.
Georg Thieme Verlag Stuttgart 714, 1965

128. JOSEPH. In: Gregg et al.: Pathogenesis of Otosclerosis.
Laryngoscope. 75: 1268, 1965

129. NAGER, F.R. Zur Klinik und pathologischen Anatomie der Otosklerose.
Acta oto-laryng. 27: 542-, 1939

130. NAGER, F.R. In: Fowler, E.P.: Medicine of the ear.
New York: Thomas Nelson 1947

131. SERCER, A. Etiopathogenie de l'otosclèrose.
Progr. Otorhinolaryng. 8: (Rapp I) 188, '61

132. WEBER, M. Otosklerose und Umbau der Labyrinthkapsel.
Leipzig. 1935

Herrn Professor Dr. med. W. Kley danke ich für die Überlassung des Dissertationsthema und die mir in der HNO-Klinik gebotenen Arbeitsmöglichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. K. Schindler für die ständige Unterstützung und die vielen Ratschläge bei der Durchführung meiner Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 29. April 1953 wurde ich als Sohn des Beamten Johannes Tjandrakusuma und seiner Frau Lanihwati in Surabaja-Indonesien geboren.

Nach dem Abitur im November 1971 ging ich nach Deutschland, um Medizin zu studieren.
Ich mußte zunächst das Studienkolleg in München besuchen und nach dem WS 1972/73 bestand ich die Feststellungsprüfung zur Aufnahme des Studiums der Medizin.

Im SS 1973 begann ich das Studium der Medizin in Würzburg.
Ich absolvierte: Die ärztliche Vorprüfung nach dem SS 1975
Die erste ärztl. Prüfung nach dem SS 1976
Die zweite ärztl. Prüfung nach dem WS '78/79

Danach fing ich mit meinem praktischen Jahr in der Universitäts-Klinik Würzburg an; nach dem WS 1979/80 bestand ich die dritte ärztliche Prüfung.

Würzburg , den 1 Juli 1982

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80